

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
GENEETIKA ÕPPETOOL

Artemi Maljavin

**„Mutageensuse“ operoni osalus *Pseudomonas putida* rakkudes toimuvates
mutatsiooniprotsessides.**

Magistritöö

Juhendajad : PhD Maia Kivisaar

MSc Tatjana Jatsenko

TARTU 2015

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1 DNA kahjustuste talumise mehhanismid bakterites	6
1.1.1 Eksogeensed ja endogeensed DNA kahjustused	6
1.2 SOS vastus bakterites	7
1.2.1 DNA kahjustustest ülesünteesil osalevad DNA polümeraasid	8
1.2.2 Erinevade DNA polümeraaside juurdepääsu kontrollivad mehhanismid bakteris <i>E. coli</i>	11
1.3 <i>recJ</i> roll genoomi terviklikkuse säilitamisel	15
1.4 „Mutageensuse“ operon bakterites	17
1.4.1 Operoni levik erinevates bakteris	17
1.4.2 Imu valkude ja DnaE2 funktsioonid bakterites	18
1.4.2 DnaE2	20
2. Eksperimentaالosa.....	21
2.1 Töö eesmärgid.....	21
2.2 Materjal ja meetodika	22
2.2.1. Söötmed, bakteritüved ja plasmiidid	22
2.2.2. PCR	26
2.2.3. Bakterite konjugatsioon	27
2.2.4. Bakterite elektroporatsioon	27
2.2.5. Plasmidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs	28

2.2.6. <i>P. putida</i> <i>recJ</i> geeni suhtes defektse tüvide konstrueerimine.	28
2.2.7. <i>P. putida</i> Rif resistentsete mutantide tekkesageduse määramine.....	29
2.2.8. “Täpikitse” mutantide MMS, NQO, MNNG tolerantsuse testimiseks.....	31
2.2.10. Bakteri adenülaadi tsüklaasi aktiivsusel põhinev kaksikhübriid süsteem (BACTH)	31
3. Tulemused ja arutelu	34
3.1 <i>P. putida</i> „Mutageensuse“ operoni valkude vahelist interaktsioonide määramine <i>in vivo</i>	34
3.2 Spetsialiseerunud DNA polümeraaside osalus spontaansete mutatsioonide tekkel <i>recJ</i> defektsetel tüvedel.....	35
3.3 Eksogeenseid DNA kahjustusi põhjustavate kemikaalide mõju <i>recJ</i> ja spetsialiseerunud DNA polümeraaside defektsetele tüvedele.....	37
3.4 „Mutageensuse“ operoni osalus UV-indutseeritud mutageneesil <i>recJ</i> defektsetel tüvedel	40
3.5 „Mutageensuse“ operoni osalus MMC-indutseeritud mutageneesil <i>recJ</i> defektsetel tüvedel	41
3.6 „Mutageensuse“ operoni roll <i>P. putida</i> rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides	42
Kokkuvõte	45
Summary.....	46
Kasutatud kirjandus	48
Kasutatud veebiadressid	57

Kasutatud lühendid

Amp	(<i>Ampicilin</i>) ampitsiliin
AP	(<i>Apurinic - Apyrimidinic Site</i>) apuriin/apurimidiin sait
ATP	(<i>Adenosintriphosphat</i>) adenosiintrifosfaat
BER	(<i>Base Excision Repair</i>) aluse väljalõike reparatsioon
cAMP	(<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>) tsükliline adenosiinmonofosfaat
CAA	(<i>Casamino Acids</i>) aminohapete lahus
CFU	(<i>Colony Forming Units</i>) kolooniat moodustavate rakkude arvukus
CPD	(<i>Cyclobutane Pyrimidine Dimer</i>) tsüklobutaan pürimidiin dimeer
kb	(<i>kilobase pair</i>) kiloaluspaar
Km	(<i>Kanamycin</i>) kanamütsiin
MMR	(<i>Mismatch Repair System</i>) valepaardumise reparatsiooni süsteem
MMC	(<i>Mitomycin C</i>) mitomütsiin C
MMS	metüülmetaan sulfonaat
MNNG	N-metüül-N'-nitro-N-nitrosoguanidiin
NER	(<i>Nucleotide Excision Repair</i>) nukleotiidi väljalõike reparatsioon
NQO	4-nitrokinoliin-1-oksiid
PCR	(<i>Polymerase Chain Reaction</i>) Polümeraasi ahela reaktsioon
Pol	(<i>Polymerase</i>) DNA polümeraas
Rif	(<i>Rifampicin</i>) Rifampitsiin
ROS	(<i>Reactive Oxygen Species</i>) reaktiivsed hapnikuühendid
ssDNA	(<i>single stranded DNA</i>) üheaahelaline DNA
TLS	(<i>translesion DNA synthesis</i>) DNA kahjustusest ülesüntees
UV	(<i>Ultraviolet Radiation</i>) ultraviolettkiirgus

Sissejuhatus

DNA ja teiste raku komponentide kahjustused tekivad bakterite elutegevuse käigus pidevalt. Nende kõrvaldamine on elutähtis, sest need kahjustused on tsütotoksilised. Seetõttu on kõigis elusorganismides arenenud välja DNA kahjustuste tolereerimis- ja reparatsioonisüsteemid. Põhiliseks kaitseksüsteemiks bakterites on SOS vastus. SOS vastus on indutseeritud DNA kahjustuste korral ja selles osaleb rohkem kui 40 geeni. Raku prioriteediks on DNA kahjustused parandada enne, kui sealt jätkub replikatsioon, sest DNA sünteesil vigaselt DNA-lt tekivad mutatsioonid. Bakteris *E. coli* mängib olulist rolli selles, et kahjustused kõrvaldataks DNA reparatsiooni teel, RecJ eksonukleas. Juhul kui kahjustusi ei suudeta parandada, toimub kahjustatud DNA-lt üle kahjustuse süntees (ingl. k. *translesion DNA synthesis*, TLS), mis on potentsiaalselt mutageenne. TLS-i viivad läbi spetsialiseerunud DNA polümeraasid, mis on levinud kõikides elusorganismides. Bakteris *E. coli* on neid näiteks 3: Pol II, Pol IV ja Pol V, kusjuures Pol IV ja Pol V poolt läbiviidav DNA süntees on vigaderohke, kuna neil puudub erinevalt replikatiivsest DNA polümeraasist vigu korrigeeriv aktiivsus. Kõik nad on spetsialiseerunud kindlat tüüpi DNA kahjustuste ületamiseks. Näiteks. Pol V ületab UV-indutseeritud kahjustusi ja põhjustab mutatsioone. Fülogeneetilise analüüsi tulemused näitavad, et bakteritel, kellel puudub *E. coli* Pol V homoloogid esineb nn. „mutageensuse“ operon. Arvatakse, et selle operoni poolt kodeeritud geenid võivad täita Pol V sarnast funktsiooni ja osaleda TLS-is. Bakteris *P. putida* koosneb „mutageensuse“ operon neljast geenist (*lexA2*, *imuA*, *imuB*, *dnaE2*) ja kulub SOS vastuse reguloni. Nende geenide rolli DNA kahjustuste tolereerimisel on seni vähe uuritud.

Käesoleva töö eesmärgiks oli selgitada „mutageensuse“ operoni rolli *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides, teha kindlaks, kas operoni poolt kodeeritud valgud interakteeruvad omavahel ja teiste replikatsiooni valkudega *in vivo* ning selgitada RecJ mõju „mutageensuse“ operoni tööle.

1. Kirjanduse ülevaade

1. 1 DNA kahjustuste talumise mehhanismid bakterites

1.1.1 Eksogeensed ja endogeensed DNA kahjustused

Keskkonna tingimused ei ole enamasti ajast bakterite eluks optimaalsed. Toitainete puudujääk, kõikumised keskkonna pH väärtustes, liiga kõrge või madal temperatuur häirivad nende elu. Kiirgus, endo- ja eksogeense päritoluga kahjulikud ühendid kahjustavad raku komponente – valke, lipide ja DNA-d.

Oksüdatiivne DNA kahjustus

Oksüdatiivne stress on aeroobsetes tingimustes vältimatuelutegevuse tagajärg. Reaktiivsed hapnikuühendid (ingl. k. *Reactive Oxygen Species*, ROS) tekitavad pidevalt metabolismi käigus. Samuti põhjustavad nende teket erinevad raku väliskeskkonnasolevad kemikaalid. ROS on põhiline DNA kahjustuse tekitaja rakus (Davies, 1999). Näiteks hüdroksüülradikaal põhjustab üle 80 erineva DNA kahjustuse (Bjelland ja Seeberg, 2003). Enimlevinud oksüdatiivse kahjustuse vorm on 8-oksüguaniin (8-oksüG) või tema isomeerne vorm hüdroksüguaniin. 8-oksüG võib paarduda adeniiniga, põhjustades asendusmutatsioone (Cheng *et al.*, 1992).

UV-kiirgus

UV-kiirgus on üks esimesi DNA kahjustuste põhjustajaid, mida hakati uurima. Rakud pidid UV-kiirgusega toime tulema juba alates elutekkimisest. Vastavalt lainepikkusele klassifitseeritakse UV-kiirgust kolmeks osaks: UV-A (320-400 nm), UV-B (295-320 nm) ja UV-C (100-295 nm). Looduses puutuvad rakud põhiliselt kokku UV-A ja UV-B kiirgusega, laborikatsetes kasutatakse aga enamasti UV-C kiirgust lainepikkusega 254 nm, mis kahjustab DNA-d. Kui rakud on kiiritatud UV-C kiirgusega, moodustuvad suures osas tsüklobutaan pürimidiin dimeerid (ingl. k. *Cyclobutane Pyrimidine Dimer*, CPD). CPD tekib, kui kahe kõrvalasuva pürimidiini vahel moodustub kovalentne side. Enimlevinud CPD on tümiini dimeeride fotoprodukt (Goosen ja Moolenaar, 2008).

DNA alküleerimine

Ühendid, mis metüleerivad DNA-d, võivad reageerida DNA-ga 12 erinevas kohas. Kahjustuse koht sõltub kahjustava kemikaali tüübist ja toimemehhanismist, mille alusel jaotatakse neid S_N1- ja S_N2-tüüpi alküleerivateks ühenditeks. Enim levinud on 7-metüülguaniini (7-meG) ja

3-metüüladeniini (3-meA) kahjustused (Aas *et al.*, 2003). DNA-d alküleerivad ühendid võivad olla kas keskkonnast pärit või endogeenselt tekkinud metabolismi produktid (Drabløs *et al.*, 2004).

S_N2-tüüpi ühendid nagu metüülmetaan sulfonaat (MMS) ja endogeense päritoluga metüül haliidid (näiteks metüülkloriid, metüülbromiid ja metüüljoodiid) põhjustavad lisaks eelpool nimetatutele 1-metüüladeniini (1-meA) ja 3-metüültsütosiini (3-meC) teket. 7-meG on suhteliselt ohutu DNA kahjustus, samal ajal kui 3-meA, 1-meA ja 3-meC blokeerivad DNA replikatsiooni, mille pärast on nad tsütotoksilised DNA kahjustused (Sedgwick, 2004). S_N2-tüüpi ühendid põhjustavad peamiselt N-metüülatsiooni, reageerides lämmastikaluste N-aatomitega (Strauss *et al.*, 1975).

S_N1-tüüpi ühendid, nagu näiteks N-metüül-N'-nitro-N-nitrosoguanidiin (MNNG), on mutageensemad, põhjustades nii N- kui ka O-metüülatsiooni, reageerides nii lämmastikaluste N- kui ka O-aatomitega. Näiteks reageerides lämmastikaluse hapnikuga, moodustub O⁶-metüülguaniin (O⁶-meG) või O⁴-metüültümiini (O⁴-meT). O⁶-meG paardub tümiiniga ja põhjustab GC-AT transitsiooni (Bignami *et al.*, 2000). Puriinid, mis on metüleeritud N³ või N⁷ positsioonidest, võidakse kergesti hüdrolüüsida, nii et tekivad lämmastikaluseta saidid (ingl. k. *abasic sites*, AP), mis on rakkudele toksilised (Friedberg *et al.*, 2005).

1. 2 SOS vastus bakterites

Selleks, et DNA kahjustused ei põhjustaks raku surma, on bakterites välja kujunenud kaitsesüsteemid. Põhiliseks kaitseks bakterites on nn. SOS vastus (Patel *et al.*, 2010). Bakteri *E. coli* puhul kuuluvad SOS geenivõrgustikku rohkem kui 40 geeni, mis on normaalsetes tingimustes repressseeritud, kuid indutseeritatakse stressi puhul (Fernandez de Henestrosa *et al.*, 2000). Laias laastus saab SOS geene jagada kaheks rühmaks: ühed vastutavad DNA kahjustuste parandamise eest (NER, BER, homoloogiline rekombinatsioon), teised aga kahjustuste tolereerimise eest DNA kahjustustelt ülesünteesil (ingl. k. *translesion DNA synthesis*, TLS) (Patel *et al.*, 2010).

SOS vastus on reguleeritud LexA repressorvalgu poolt. LexA moodustub dimeere ja seondub SOS geenide promootoralaga, pärsides sellega nende ekspressiooni (Sanchez-Alberola *et al.*, 2012). LexA valk seondub palindroomse motiiviga CTGT-N₈-ACAG, mis on tuntud kui LexA- või SOS-boks (Little ja Mount, 1982; Wertman ja Mount, 1985). SOS geenid aktiveeritatakse DNA kahjustuste tekkimisel. Tsentraalne roll selles protsessis on RecA

valgul. RecA seondub üksikahelalise DNA-ga (ssDNA), moodustades nukleoproteiin filamente. Need filamendid seonduvad LexA-ga ja põhjustavad tema autokatalüütilist proteolüüsi (Butala *et al.*, 2009). Lõigatud LexA dimeer ei suuda enam DNA-ga seonduda, mille tulemusena SOS geene ekspressioon aktiveeritakse (Little, 1991). Kui DNA kahjustusi parandatakse, RecA valgu tase rakus langeb ning uuesti sünteesitud LexA seondub jälle SOS geenide promootoralaga ja pärsib nende ekspressiooni (Sanchez-Alberola *et al.*, 2012).

DNA parandamisel osalevate ensüümide geenid aktiveeritakse varem kui TLS-is osalevate DNA polümeraaside geenid. *E. coli* rakkudes on SOS vastuse regulatsioonis kesksel kohal UmuD valk, mis mängib kriitilist rolli DinB ja UmuC aktiivsuse reguleerimisel (Ippoliti *et al.*, 2012). UmuD valk on kodeeritud *umuDC* operoni poolt ja moodustab erinevaid dimeere (Godoy *et al.*, 2007). UmuD₂ on peamine valguvorm esimesel 20-40 minutil pärast SOS vastuse aktivatsiooni. Selline valguvorm inhibeerib *E. coli* rakkudes DNA replikatsiooni, näiteks UV-ga kiiritamise korral, et saaks toimuda DNA reparatsioon (Opperman *et al.*, 1999). RecA/ssDNA nukleoproteiini seondumine UmuD₂ valguga põhjustab viimase autokatalüütilist lõikamist, mille tulemusena moodustub UmuD'₂ (Burckhardt *et al.*, 1988; Nohni *et al.*, 1988; Shinagawa *et al.*, 1988). Selline protsess sarnaneb LexA autokatalüütilise lõikamisega, kuigi RecA/ssDNA katalüüsib efektiivsemalt LexA lõikust (Burckhardt *et al.*, 1988). UmuD lõikamine toimub tavaliselt alles 20-40 minutit pärast SOS vastuse aktivatsiooni (Friedberg *et al.*, 2005; Opperman *et al.*, 1999). Lõigatud UmuD₂, UmuD'₂, seondub UmuC-ga, moodustades UmuD'₂C kompleksi e. DNA polümeraasi V (Pol V), mis on suuteline viima läbi DNA kahjustustelt ülesünteesi e. TLS-i (Friedberg *et al.*, 2005). Seega täispikk UmuD₂ osaleb mutageneesi ärahoidmisel, UmuD'₂ vastupidi aga osaleb mutageneesil. Kui DNA kahjustusi ei ole suudetud parandada, UmuD lõikamine lülitab sisse SOS vastuse mutageenset faasi, et jätkata replikatsiooni kahjustatud DNA-lt (Ollivierre *et al.*, 2010).

1.2.1 DNA kahjustustest ülesünteesil osalevad DNA polümeraasid

Replikatiivsed DNA polümeraasid ei suuda läbi viia replikatsiooni üle DNA kahjustuste (Lindahl, 1993). Kuna DNA replikatsiooni jätkamine vaatamata kahjustustele on ülitähtis raku ellu jäämiseks, on kõigis elusorganismides välja kujunenud spetsiifilised DNA polümeraasid, mis on suutelised sünteesima DNA-d üle kahjustuste (Ippoliti *et al.*, 2012). Näiteks bakteris *E. coli* on neid 3, pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* samuti 3, inimesel aga 10. Enamasti kuuluvad need spetsialiseerunud DNA polümeraasid (ingl. k. *specialized DNA polymerases*) Y perekonda (Tabel 1) (Friedberg *et al.*, 2005). DNA polümeraase, mis

inkorporeerivad nukleotiide DNA kahjustuste vastu, nimetatakse ka TLS polümeraasideks (Bridges *et al.*, 2005; Ohmori *et al.*, 2001; Radman *et al.*, 1975). Nende spetsialiseerunud DNA polümeraaside hulk rakus on tugevalt reguleeritud. Näiteks bakteris *E.coli* on geenid, mis kodeerivad TLS polümeraase, represseeritud LexA valku poolt ja on SOS vastuse komponendid. Normaalses elutingimustes (ilma stressita) on nende geeniproduktide tase madal, kuid suureneb drastiliselt stressi korral (Friedberg *et al.*, 2005).

Tabel 1. Spetsialiseerunud DNA polümeraasid (Friedberg *et al.*, 2005).

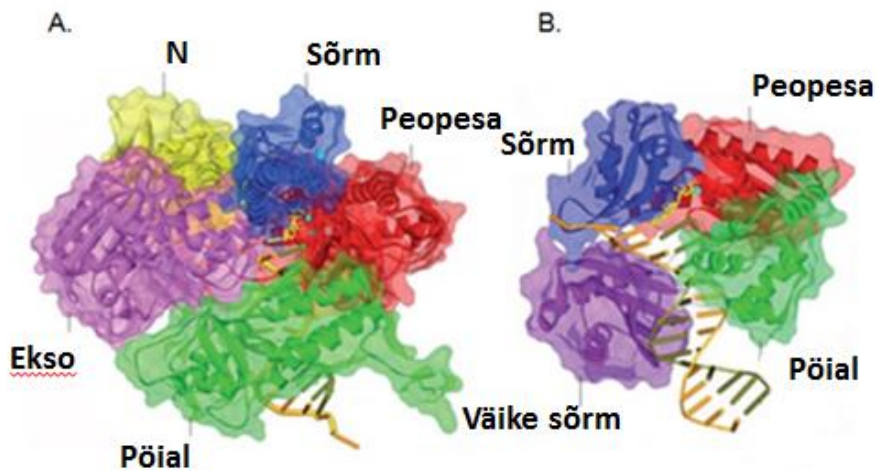
Bakter	Pärm (<i>S. cerevisiae</i>)	Inimene	Polümeraasi perekond
Pol II			B
Pol IV			Y
Pol V			Y
	Rev1	Rev1	Y
	Pol ζ	Pol ζ	B
	Pol η	Pol η	Y
		Pol κ	Y
		Pol ι	Y
		Pol λ	X
		Pol μ	X
		Pol β	X
		Pol θ	A
		Pol ν	A

Kõik TLS polümeraasid jagavad ühiseid iseloomujooni (Prakash *et al.*, 2005):

1. Nad on suutlised replitseerima DNA-d kahjustuste kohalt, kus replikatiivne DNA polümeraas jääb seisma.
2. Vaatamata sellele, et kõikide TLS polümeraaside primaarne struktuur sarnaneb, on nad spetsialiseeritud kindlatele DNA kahjustustele. See tähendab, et erinevate TLS polümeraaside puhul võib samast kahjustusest ülesüntees toimuda sõltuvalt polümeraasist kas veavabalt või vigutekitavalt.
3. β -klamber (eukarüootidel PCNA) on tsentraalne platvorm, kuhu seonduvad TLS polümeraasid selleks, et pääseda ligi DNA kahjustusele ja osaleda DNA replikatsioonil.
4. Neil puudub 3' - 5' eksonukleasne vigukorregeeriv (*proofreading*) aktiivsus.

Selleks, et täita oma funktsioone, peavad TLS DNA polümeraasid omama spetsiifilist struktuuri (joonis 1, B). Nende struktuursed isepärasused saab summeerida järgnevalt (Ippoliti *et al.*, 2012):

1. Ruumikas ja mahukas aktiivtsenter, mis võimaldab kahjustatud DNA alustel siseneda katalüütilisse tsentrisse.
2. On olemas väikese sõrme domään.
3. Puudub alfa-heeliks (O-heeliks), mis aitab replikatiivsetel DNA polümeraasidel tagada DNA replikatsiooni täpsust.



Joonis 1. B- ja Y-perekonda kuuluvate DNA polümeraaside struktuurid. A. Bakteriofaagi RB69 B-perekonda kuuluva DNA polümeraasi struktuur kompleksis DNA-ga. Põhilised domäänid on värvitud järgmiselt: peopesa - punane, põial - roheline, sõrm - sinine, eksonukleaaas (ekso) - purpurne, N-terminaalne domään (N) - kollane. **B.** Y-perekonda kuuluva arhest *Sulfolobus solfataricus* pärit DNA polümeraasi Dpo4 struktuur kompleksis DNA-ga (Sale *et al.*, 2012 järgi).

1.2.2 Erinevade DNA polümeraaside juurdepääsu kontrollivad mehhanismid bakteris *E. coli*

Bakteris *E. coli* on kirjeldatud viis DNA polümeraasi. Neist kolm, Pol II, Pol IV a Pol V, on TLS DNA polümeraasid (Fijalkowska *et al.*, 2012).

Pol IV

DNA polümeraas Pol IV (DinB) on kodeeritud DNA kahjustuste korral indutseeritava *dinB* (*dinP*) geeni poolt (Wagner *et al.*, 1999). DinB on üks kolmest TLS polümeraasidest bakteris *E. coli* (Pol IV). Lisaks on ta ainuke Y perekonda kuuluv DNA polümeraas, mis on konserveerunud kõigil elusorganismidel (Ohmori *et al.*, 2001). Normaalses kasvutingimustes on DinB tase *E. coli* rakkudes keskmiselt 250 molekuli, kuid suureneb 10 korda SOS vastuse aktiveerimisel. Kui DinB viib läbi TLS-i, võib suurendada mutatsioonide arv, kuna DinB valgul puudub 3'-5' eksonukleaaasne aktiivsus ja tema täpsus (ingl. *fidelity*) on väiksem võrreldes replikatiivse DNA polümeraasiga (DNA Pol III) (Kim *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 1999). Teatud DNA kahjustuste puhul sünteesib DinB aga DNA-d täpselt, lülitades kahjustatud nukleotiidi vastu õige nukleotiidi. Näiteks N²-benzo[a]püreen-dG puhul lülitab DinB selle vastu eelistatult õige nukleotiidi; vale nukleotiidi lülitamine toimub sagedusega 10⁻² kuni 10⁻⁴ nukleotiidi kohta (Shen *et al.*, 2002).

E. coli tüvi, mis on defektne *dinB* geeni suhtes, on tundlik nii N²-furfurüül-dG (NFZ) kui ka 4-nitrokinoliin-1-oksiidile (NQO) (Jarosz *et al.*, 2006). Mõlemad osalevad N²-dG kahjustuse tekkimisel *in vivo* (Whiteway *et al.*, 1998; Panigrahi ja Walker, 1990). On näidatud, et DinB lülitab dCTP DNA ahelasse 15 korda suurema täpsusega NFZ kahjustuse vastu kui kahjustamata G-nukleotiidi vastu (Jarosz *et al.*, 2006).

DinB võimaldab täpset DNA sünteesi ka DNA alküülkahjustuste puhul (Bjedov *et al.*, 2007). Samuti on DinB-l oluline roll reaktiivsete hapnikuühendite (ROSi) tagajärjel tekkinud DNA kahjustuste ületamisel, kuid nende kahjustuste ületamine viib A:T → G:C transitsioonide tekkimiseni (Hori *et al.*, 2010). AP saitide läbimisel, DinB tekitab -1 raaminihke mutatsioone. DinB tekitab raaminihkemutatsioone kahjustamata DNA-l sagedusega $2,1 \times 10^{-4}$ ja asendusmutatsioone sagedusega $5,1 \times 10^{-5}$ (Kobayashi *et al.*, 2002).

DinB interakteerub paljude erinevate valkudega: UmuD₂, RecA, NusA, Rep helikaas, ssDNA-ga seonduv valk (SSB), β-klamper (Godoy *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2009; Cohen *et al.*, 2010; Sladewski *et al.*, 2011; Furukohri *et al.*, 2012). RecA ja UmuD seonduvad DinB-ga ja võimaldavad tema täpsust. Nende valkude juuresolekul väheneb raaminihkemutatsioone teke *in vitro*. Godoy *et al.* (2007) pakkusid mudelit, kus RecA ja UmuD moodustavad kompleksit DinB-ga, mille tagajärjel muutub aktiivtsentr väiksemaks, ja päsib sellega suurte DNA kahjustuste sisenemist aktiivsaiti (Godoy *et al.*, 2007). NusA, mis osaleb transkriptsiooni elongatsioonil ja terminatsioonil seondub DinB-ga siis, kui RNA polümeraas jääb seisma ssDNA tühimiku kohal. Sel juhul toimub transkriptsiooniga seotud TLS (Cohen *et al.*, 2009; Cohen *et al.*, 2010). DinB C-terminaalne domään seondub β-klambriga, mis suurendab teda protsessiivsust (Wagner *et al.*, 2000).

Üldiselt saab öelda, et DinB täidab vähemalt 2 rolli rakus: ületab veavabalt teatud DNA kahjustuste tüüpi, teiseks – tekitab raaminihke mutatsioone stressitingimustes (Godoy *et al.*, 2007).

Pol V

DNA polümeraas Pol V on kodeeritud *umuC* ja *umuD* geenide poolt, mis kuuluvad ühte operoni. Selleks, et moodustuks aktiivne Pol V, peab toimuma UmuD₂ autokatalüütiline lõikamine, millele järgneb UmuD' seondumine UmuC-ga. Seega on DNA Pol V UmuD'₂C heterotrimeerne kompleks. Mõlemad geenid kuluvad SOS vastuse reguloni ja UmuC ning

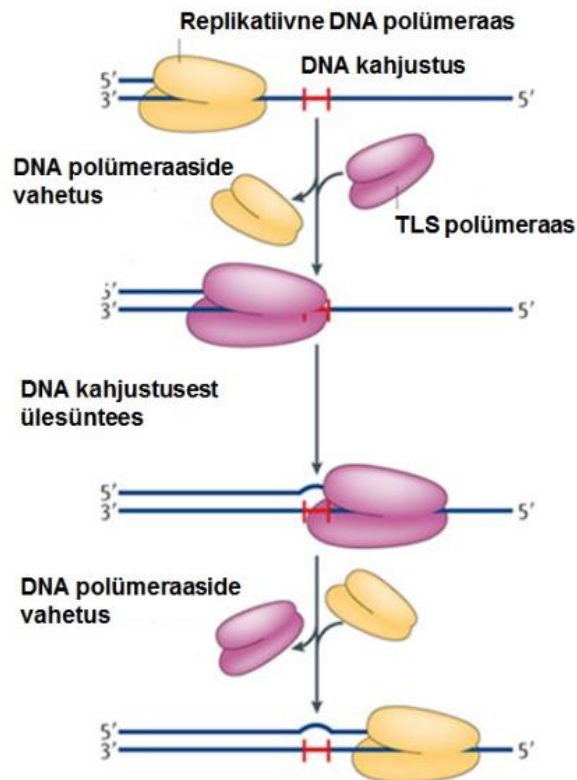
UmuD valkude basaalne tase rakus on madal (keskmiselt 15 UmuC molekuli ja 180 UmuD) ja suureneb 10 korda SOS vastuse aktiveerimisel (Tang *et al.*, 1999).

Üldiselt võib öelda, et Pol V ületab neid kahjustusi, mida Pol IV ei suuda. Pol V ületab UV kiiritlemisega tekkinud DNA kahjustusi nagu näiteks T-T dimeere, *cis-syn* tsüklobutaan püromidiin dimeere (CPD) ja T-T fotoprodukte. Teatud DNA kahjustuste puhul võimaldab Pol V sünteesida DNA-d veavabalt. Näiteks inkorporeerib Pol V dATP vastu T-T CPD ja dCTP vastu C⁸-AAF-dG (Ippoliti *et al.*, 2012). Samas kahjustamata DNA sünteesil tekivad vead sagedusega 10^{-3} kuni 10^{-4} nukleotiidi kohta. Pol V on potentsiaalselt mutageenne ka mitmete DNA kahjustuste korral. Näiteks lisab ta dGTP T-T fotoproduktide vastu 6 korda sagedamini kui dATP (Tang *et al.*, 2000).

1.2.3 TLS-i mehhanism

Selleks, et TLS saaks toimuda, peavad DNA kahjustustele spetsialiseerunud DNA polümeraasid pääsema ligi DNA-le ja asendama replikatiivset DNA polümeraasi Pol III. TLS-i mehhanismide selgitamiseks on pakutatud välja kaks võimalikku mudelit: *switching* e. DNA polümeraaside vahetuse mudel ja *gap-filling* e. tühimike-täitmise mudel (Waters *et al.*, 2009). *Switching*-u mudeli korral toimub DNA polümeraaside vahetus DNA kahjustuse kohal, pärast kahjustuse ületamist jätkab TLS polümeraas sünteesi, inkorporeerides kuni 20 nukleotiidi. Seejärel TLS polümeraas dissotsieerub ning replikatiivse DNA polümeraasi kompleks seondub taas DNA-ga ja replikatsioon jätkub (joonis 2) (Schlacher *et al.*, 2005). Siin tasub rõhutada, et kahjustus jääb alles ja seekõrvaldatakse hiljem raku DNA reparatsioonisüsteemide abil (Waters *et al.*, 2009).

TLS võib leida aset ka postreplikatiivselt ssDNA tühimike täitmisel (Lehman ja Fuchs, 2006; Lopes *et al.*, 2006; Waters ja Walker, 2006). Selline TLS mehhanism kannab nime *gap-filling*. Tühimikud võivad tekkida, kui replikatsioon taaskäivitatakse DNA kahjustusest allavoolu. TLS polümeraas seondub ssDNA-ga kahjustuse kohal, ületab DNA sünteesil kahjustuse ja täidab tühimiku (Waters *et al.*, 2009).



Joonis 2. TLS-i *switching*'u mehhanism *E. coli* rakkudes. Kui replikatiivne DNA polümeraas jõuab DNA kahjustuseni, peatub replikatsioon. Seejärel vahetab TLS polümeraas koha replikatiivse DNA polümeraasiga (Pol III) ja seondub DNA-ga. Seejärel sünteesib ta DNA-d, ületades kahjustuse ning lülitades veel ligikaudu 20 nukleotiidi DNA ahelasse. Peale seda toimub polümeraaside vahetus, ja replikatsioon jätkab Pol III. DNA kahjustus jääb matriitsahelasse alles (Sale *et al.*, 2012 järgi).

1.3 *recJ* roll genoomi terviklikkuse säilitamisel

Bakteris *E. coli* eemaldatakse nii üksik- kui ka kaskikahelalise DNA katkeid homoloogilise rekombinatsiooniga, mis on üldiselt veavaba. On olemas 2 homoloogilise rekombinatsiooni rada: RecBCD ja RecFOR sõltuvad. RecBCD on spetsialiseerunud eemaldama kaksikahelaliseid katkeid (ingl, k. *Double Strand Breaks*, DSB) ja RecFOR eemaldab üksikahelalise DNA katkeid. Samas on näidatud, et RecFOR osaleb ka DSB eemaldamisel. RecFOR homoloogilise rekombinatsiooni rajasse kulub ka RecJ (Nowosielska *et al.*, 2006).

Bakteris *E. coli* *recJ* geen kodeerib Mg^{2+} -sõltuvat üksikahelalise DNA spetsiifilist 5'-3'aktiivsusega eksonukleaasi (Lovett ja Kolodner, 1989). RecJ töötab koos RecQ (helikaas) valguga. Morimatsu ja Kowalczykowski (2014) näitasid, et RecJ ja RecQ on suutelised produtseerima 3' väljaulatuva otsa iga DSB tüüpi puhul (3' või 5' väljaulatuvad otsad, tõmbid otsad). ssDNA ahela tekitamine on esimene etapp RecFOR rekombinatsiooni rajas ja ilma selleta ei saa rekombinatsioon toimuda. Seega RecJ on vajalik RecFOR tööks (Morimatsu ja Kowalczykowski, 2014).

Kehtiva mudeli järgi osaleb RecJ DNA stabiilsuse ja terviklikkuse säilitamisel (Courcelle ja Hanawalt, 1999; Courcelle *et al.*, 2006). RecJ ortoloogid on leitud kõikides bakteri- ja arhede liikides, välja arvatud *M. tuberculosis* ja *mycoplasma*, mis viitab RecJ varajasele tekkele evolutsioonis ja tema olulisusele bioloogilistes protsessides (Han *et al.*, 2006).

Courcelle *et al.* (2006) näitasid, et bakteris *E. coli* on RecJ oluline DNA replikatsiooni taastamiseks kahjustuse kohalt. UV-kiiritatud rakkudel puudus NER defektsel tüvel replikatsiooni taastamine (NER on põhiline reparatsioonisüsteem UV-indutseeritud kahjustuste puhul) 15 minutit peale kiiritamist. Teiselt poolt, Pol V defektsel tüvel oli replikatsiooni taaskäivitamise tase võrreldav metsiktüübiga. *recJ* defektsel tüvel aga ei toimunud DNA sünteesi taaskäivitamist esimese tunni jooksul. Selline tulemus oli huvitav, kuna *E. coli* RecJ defektsel tüvel on UV-taluvus võrreldav metsiktüve UV-taluvusega. RecJ ja Pol V topeltdefektsel tüvel ei toimunud taaskäivetamist üldse. Samas, RecJ puudumisel muutus Pol V kriitiliseks komponendiks raku ellujäämisel. RecJ mutandi ellujäämine suurtel UV doosidel näitas, et Pol V vastutab rakkude ellujäämise eest ja on suuteline tagama metsiktüübi UV-taluvuse taset (Courcelle *et al.*, 2006).

Juhul kui replikaas jõuab UV-indutseeritud DNA kahjustuse kohale, keerab RecQ vastasünteesitud mahajääva DNA ahela lahti ja RecJ degradeerib seda. Seejärel seondub RecA ssDNA-ga selleks, et stabiliseerida seda senikaua, kuni kahjustus on parandatud NER poolt ja

replikatsioon on taaskäivitatud. RecJ puudumisel võib ssDNA stabiliseerimine RecA-ga olla pärsitud, kui ssDNA jupp on liiga lühike. Kui kahjustust ei parandata, toimub sealt Pol V abil TLS ning jätkub mõnda aega ka pärast seda. DNA süntees Pol V poolt on potentsiaalselt mutageenne (Courcelle *et al.*, 1999; Courcelle *et al.*, 2006).

Courcelle *et al.*, 2006 artiklis näidati ka seda, et RecJ puudumisel suureneb bakteris *E. coli* UV-indutseeritud mutatsioonisagedus võrreldes metsiktüvega. Pol V puudumisel ning RecJ Pol V topeltdefektsel tüvel on mutatsioonisagedus aga väga madal. Saadud tulemus viitab sellele, et Pol V vastutab UV-indutseeritud mutageneesi eest, RecJ puudumisel ületatakse kahjustusi ainult TLS-iga. Seega tagab RecJ selle, et eelisjärjekorras toimub DNA kahjustuste kõrvaldamine ja alles siis TLS, kui kahjustusi ei ole suudetud kõrvaldada. RecJ on oluline raku valiku tegemisel ja tema juuresolekul eelistab rakk kahjustuse reparatsiooni üle tolereerimist.

1.4 „Mutageensuse“ operon bakterites

Bakteritel, kellel puuduvad *E. coli* DNA Pol V *umuDC* geenide homologid, esineb nn. “mutageensuse” operon (Galhardo *et al.*, 2005). “Mutageensuse” operon koosneb *imuA-imuB-dnaE2* geenidest ja on arvatud, et nende geenide poolt kodeeritud valkudel on DNA Pol V-le sarnane roll TLS-il. See operon kodeerib replikatiivse DNA polümeraasi Pol III katalüütilise subühiku homoloogi DnaE2 ja Y-perekonna DNA polümeraaside homoloogi ImuB, mis aga ei ole DNA polümeraas. ImuA valgu aminohappelisel järjestusel on teatav sarnasus LexA, Sula ja RecA valkude järjestustega (Ippoliti *et al.*, 2012). Operon kuulub SOS vastuse reguloni ning on reguleeritud LexA valgu kaudu (Erill *et al.*, 2006).

1.4.1 Operoni levik erinevates bakteris

Erill *et al.* (2006) näitasid, et *imuA-imuB-dnaE2* geenide kassett on laialt levinud bakterihõimkondades ja hõlmab nii aktinobaktereid kui ka proteobaktereid. Fülogeneetilise analüüsi tulemused viitavad sellele, et “mutageensuse” operon läbis mitmeid geneetilisi ümberkorraldusi tema tekkehetkest aktinobakteril, ja et see operon on levinud bakteritel tänu lateraalsele geeniülekanale (Erill *et al.*, 2006). Seega võivad erinevatel bakteritel esineda erinevad kasseti kombinatsioonid.

Kõige lihtsam kasseti versioon on leitud aktinobakteritel *Kineococcus radiotolerans*, *Symbeobacterium thermophilum* ja *Actinomyces naeslundii* ja koosneb ainult *dnaE2* geenist. *Streptomycineae* hõimkonnal moodustuvad kassetti kaks geeni - *dnaE2* ja *imuB*. Võib olla ka nii, et kassett on jagatud kaheks osaks: eraldi seisev *dnaE2* ja koos olevad *imuA'-imuB*. Sellisel kujul on need geenid näiteks *Mycobacterium tuberculosis* ja *Nocardia farcinica* bakteritel. *imuA'-imuB-dnaE2* kujul on kassett leitud näiteks *Nocardioides* sp. ja *Brevibacterium linens* bakteritel (Erill *et al.*, 2006).

Proteobakteritel nagu *Thermobacterium roseum*, *Verrucomicrobium spinosum*, *Acidobacterium capsulatum* ja *Solibacter usitatus* esineb *imuA'-imuB-dnaE2* kassett. Ühine kassetti konfiguratsioon viitab vertikaalsele geeni ülekanale ühisest eellasest (*common ancestor*) aktinobakteritel ja ulatub delta-proteobakteriteni (Erill *et al.*, 2006).

Mingil hetkel toimus kassetti levikus *imuA'* geeni täielik või osaline vahetus homoloogilise rekombinatsiooni tagajärjel, mis viis *imuA* geeni tekkemiseni (Erill *et al.*, 2006). Kuna *imuA'* ja *imuA* geenide järjestused ei ole konserveerunud, on nad pigem funktsionaalsed analoogid kui homologid (Galhardo *et al.*, 2005).

imuA-imuB-dnaE2 kassetti on leitud delta-, alfa-, ja gamma-proteobakteritel, näiteks bakteritel *Caulobacter crescentus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Shewanella oneidensis*, *Vibrio parahaemolyticus*. Lisaks on beeta- ja gammaproteobakteritel avastatud ka neljast geenist koosnev kassett *lexA2-imuA-imuB-dnaE2*. Selline kassett on levinud ka pseudomonaadides, kaasa arvatud bakteris *Pseudomonas putida* (Abella *et al.*, 2004).

1.4.2 Imu valkude ja DnaE2 funktsioonid bakterites

“Mutageensuse” operoni geenide funktsioone on vähe uuritud. Bakteris *Caulobacter crescentus* vastutab operon DNA kahjustustest indutseeritud mutageneesi eest. Operoni promootoralal on repressorvalgu LexA seondumisalad ning operoni geenide transkriptsioon indutseeritakse sarnaselt bakteris *E. coli* kirjeldatud SOS vastusele. Galhardo *et al.* (2005) testisid *imuAB* ja *dnaE2* geenide rolli UV-mutageneesil bakteris *Caulobacter crescentus*. Bakteri *C. crescentus* üksikmutandid (puudub *imuA*, *imuB* või *dnaE2* geen) olid võrreldes metsiktüübiga UV-kiirgusele tundlikumad. Topeltmutandil (*imuB* ja *dnaE2* geenid katkestatud) oli UV-kiirguse taluvus võrreldav üksikmutantidega. Üksikmutantidel oli mutatsiooni tekkesagedus kaks korda madalam võrreldes metsiktüübiga ja sarnane topeltmutandiga (*imuB dnaE2*), mis viitab sellele, et sarnaselt umuDC-le on need geenid seotud DNA kahjustustest indutseeritud mutageneesiga. Analoogiline efekt oli nähtav ka DNA-d kahjustava kemikaaliga mitomütsiin C (MMC) töödeldud rakkudel. Sellest võib järeldada, et “mutageensuse” operon osaleb UV kahjustuste tolereerimisel ja kõik geenid on ühe raja komponendid (Galhardo *et al.*, 2005).

Sarnane efekt ilmnis ka bakteris *Deinococcus ficus*, kus on olemas *imuB-dnaE2* kassett. Selle bakteri üksikmutantide elumus ja mutatsioonisagedus langes UV-kiiritamise tagajärjel, mis viitab *imuB* ja *dnaE2* geenide osalemisele DNA reparatsioonil ja DNA kahjustuste tolereerimisel (Zeng *et al.*, 2011).

Bakteris *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) uurisid Warner *et al.* (2010) samuti *imu* geenide funktsioone. Selleks olid konstrueeritud üksik- (*imuA'* ja *imuB*) ja topeltmutandid (*imuA'imuB*). Kõikidel mutantidel puudus UV-kiirguse poolt indutseeritud mutagenees võrreldes metsiktüübiga. Sarnased tulemused saadi DNA-d kahjustavate kemikaalide taluvuse uurimisel *Mycobacterium smegmatis* (Msm) puhul. Msm *imuA'* ja *imuB* deletandid olid hüpersensitiivsed MMC suhtes. Kolmikmutandi (*dnaE2*, *imuB* ja *imuA'*) MMC taluvus oli võrreldav topelt- ja üksikmutantide MMC taluvusega. Lisaks oli *imuA'* ja *imuB* mutantide MMC taluvus võrreldav *dnaE2* defektse tüve MMC taluvusega, viidates sellele, et *imuA'*-*imuB/dnaE2* operoni geenid osalevad ühes DNA kahjustuste tolereerimisrajas. Need

tulemused viitasid ka sellele, et kõik operoni komponendid on individuaalselt olulised DNA kahjustuste tolereerimisel (Warner *et al.*, 2010).

Mtb ImuB valgul on olemas kõik Y-perekonna DNA polümeraaside struktuursed elemendid, kuigi tal puudub katalüütiline aktiivtsenter. Aktiivtsentri puudumine viitab sellele, et DnaE2 ja mitte ImuB viib läbi TLS-i. Selle hüpoteesi kontrollimiseks konstrueeriti Mtb*dnaE2* mutant, kus katalüütilise aktiivtsentri 2 aspartaatjääki olid asendatudalaniinidega. Selle mutandi fenotüüp sarnanes *dnaE2* deletandi fenotüübiga. Nende tulemuste põhjal järelitati, et Mtb DnaE2 katalüüsib TLS-i (Warner *et al.*, 2010).

Mtb Imu ja DnaE2 valkude puhul uuriti pärmis kaksikhübridi süsteemi abil ka nende vaheliste interaktsioonide toimumist ning interaktsioone teiste replikatsiooni valkudega. Selgus, et ImuB seondub ImuA'-ga, ImuB-ga, DnaE2-ga, β -klambriga, ning replikatiivse DNA polümeraasi katalüütilise subühikuga DnaE1. Nende andmete põhjal pakkusid Warner *et al.* (2010) välja mudeli, kus ImuA' seondub DNA-ga ja ImuB-ga, DnaE2 aga omakorda seondub ImuB kaudu β -klambriga ning katalüüsib TLS-i (joonis 3).



Joonis 3. ImuB interaktsioonid DNA kahjustuste talumisel ja DNA kahjustustest indutseeritud mutageneesil bakteris *M. tuberculosis*. Valgul ImuB on nende funktsioonide täitmisel keskne roll, kuna ta on võimeline seonduma nii β -klambriga, ImuA-ga kui ka mõlema α -subühiku koopiaga (DnaE1 ja DnaE2) (Warner *et al.*, 2010).

Pseudomonas putida tüvel KT2440 on kirjeldatud *lexA2-imuA-ImuB-dnaE2* operon, mille transkriptsioon on maha surutud LexA2 valgu poolt ja suureneb DNA kahjustuste korral (Abella *et al.*, 2004). Koorits *et al.* (2007) selgitasid *imuB* ja *dnaE2* geenide rolli *P. putida* rakkudes. Nad näitasid, et *imuB* suhtes defektses tüves oli C-nälgimise tingimustes (statsionaarse faasi mutageneesi katsed) asendus- ja raaminihkemutatsoonide tekkesagedus madalam võrreldes metsiktüübiga. *P. putida dnaE2* defektses tüves oli asendusmutatsioonide tekkesagedus aga hoopiskaks korda kõrgem kui metsiktüübil, mis viitas sellele, et *P. putida*

(Pp) DnaE2 võib mõnel juhul käituda hoopis kui antimutaator. Raaminihkemutatsioonide arv oli *dnaE2* defektses tüves võrreldav metsiktüübiga. Topeltmutandis (*imuBdnaE2*) tekkis asendusmutatsioone metsiktüübiga võrreldavalt, kuid raaminihkemutatsioonide puhul mitu korda vähem. UV-mutageneesi katsetes oli *dnaE2* defektsel tüvel kaks korda suurem mutatsioonisagedus võrreldes metsiktüübiga, mis viitas samuti sellele, et erinevalt teistes bakterites kirjeldatud DnaE2 valkudele või *P. putida* DnaE2 olla seotud veavaba DNA sünteesiga. Samas tekkis *imuB* defektsel tüvel ka bakterite UV-ga kiiritamisel mutatsioone vähem kui metsiktüübil ning *imuBdnaE2* topeltdefektsel tüvel võrreldavalt *imuB* defektse tüvega. Nende tulemuste põhjal erineb *P. putida* DnaE2 ja ImuB roll mutatsiooniprotsessides teistes bakterites kirjeldatud „mutageensuse operoni“ valkude omast; teatud tingimustel ilmnevad DnaE2-l ja ImuB-l hoopis vastandlikud efektid (Koorits *et al.*, 2007).

1.4.2 DnaE2

DnaE on bakteri replikatiivse DNA polümeraasi katalüütiline α -subühik. Ta kulub DNA polümeraasi C-perokonda ja on üks kahest replikatiivsetest DNA polümeraasidest bakterites (koos PolC-ga) (Ito ja Braithwaite, 1991), fülogeneetilise analüüsi tulemused viitavad sellele, et ta on evolutsiooni seisukohalt noor võrreldes B-perekonnaga (eukarüootne replikatiivne DNA polümeraas) (Koonin, 2006). DnaE saab jagada kolmeks grupiks: DnaE1, kõige rohkem konserveerunud ja on replikatiivse DNA polümeraasi α -subühik; DnaE2, vähemoluline (*nonessential*) DNA polümeraas, mis osaleb TLS-is; DnaE3, mittetöötav DnaE1 koopia (Timinskas *et al.*, 2014). Bakterites esinevad 3 põhilist kombinatsiooni: ainult DnaE1 või koos DnaE2-ga, PolC+DnaE3 ja PolC+DnaE1 (Timinskas *et al.*, 2014). DnaE2 ei esine kunagi üksinda geenomis ja on tüüpiline GC-rikka genoomiga bakteritele. Tema struktuur korreleerub tema funktsiooniga: mitte ükski DnaE2 ei oma CTD domääni, mis on vajalik τ -subühiku seondumiseks. τ -subühik on klambri laadija ja replisoomi tsentraalne koordinaator, kuna ta interakteerub replikatiivse helekaasiga ja α -subühikuga. Huvitav, et DnaE2 domäänide arhitektuur on sama, mis PolC/DnaE1 ellasel, ja tekitab küsimus, et kas DnaE2 arenes otseselt ellasest või kaotas CTD domääni evolutsiooni käigus (Timinskas *et al.*, 2014).

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Üheks käesoleva töö eesmärgiks oli uurida „mutageensuse“ operoni kuluvate valkude omavahelisi interaktsioone, et kontrollida, kas *P. putida* rakkudes töötab ta samal viisil nagu seni uuritud *M. tuberculosis* Imu ja DnaE2 valkude puhul. Selleks kasutasime bakteri kaksikhübriidset testsüsteemi BACTH.

Bakteris *E. coli* on näidatud, et RecJ mängib olulist rolli raku valiku tegemisel DNA kahjustuste korral ning RecJ olemasolul eelistatakse DNA reparatsiooni TLS-ile, et vähendada mutatsioonide tekke võimalust. RecJ lagundab DNA replikatsioonil vastsünteesitud mahajääva DNA ahela ja RecA seondub ssDNA-ga, stabiliseerides seda senikaua, kuni kahjustused on parandatud. RecJ puudumisel aga DNA reparatsiooni ei alkatata ja kahjustatud kohalt viib TLS-i läbi Pol V, seega suureneb mutatsioonide arv. Bakteris *P. putida* puudub Pol V, kui selle asemel on seal „mutageensuse“ operoni poolt kodeeritud valgud ImuA, ImuB ja DnaE2, mille funktsioonidest rakkudes on seni vähe teada. Meie laboris on asutud *P. putida* mutageensuse operoni valkude funktsiooni uurima seoses nende osalemisega TLS-s, kuid kuna ainult *dnaE2* ja ka teiste spetsialiseeritud DNA polümeraaside geenide deleteerimisel ei muutu *P. putida* rakkude UV kiirguse ja DNA kahjustavate kemikaalide suhtes tundlikkus võrreldes metsik-tüübiga, oli käesoleva töö eesmärgiks konstrueerida *P. putida* DNA polümeraaside suhtes defektsete tüvede baasil *recJ* (PP1477) geeni suhtes defektseid tüvesid selleks, et näha selgemalt „mutageensuse“ operoni osalust mutatsiooniprotsessides.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1. Söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

Söötmetena kasutasime LB-söödet (Miller, 1972) ja minimaalsöödet M9 baasil (Adams, 1959). Minimaalsööde sisaldas lisaks M9-le 2,5 ml/l mikroelementide lahust (Bauchop ja Elsdén, 1960) ja süsinikuallikana glükoosi (Glc) lõppkontsentratsiooniga 10 mM. Täissöötmena kasutasime LB söödet (Miller, 1972) ja M9-CAA-Glc söödet. M9-CAA-Glc sööde sisaldas lisaks minimaalsöötmele aminohapete hüdroolüsaati CAA (*casamino acids*) lõppkontsentratsiooniga 0,2%. Tardsöötme saamiseks lisasime vedelsöötmele agarit (15 g/l).

Plasmiidide ja bakteritüvede selektsiooniks kasutasime antibiootikume: ampitsilliini (Amp) 100 µg/ml, kanamütsiini (Km) 50 µg/ml, rifampitsiini (Rif) 100 µg/ml, bensüülpenitsiliin (Bp) 1,5 mg/ml.

P. putida rakke kasvasime 30°C juures, *E. coli* rakke 37°C juures. Vedelsöötmes kasvatamisel aereerisime kultuure loksutil. Töös kasutatud plasmiidid, bakteritüved ja praimerid on toodud vastavalt tabelites 2, 3 ja 4.

TABEL 2. Töös kasutatud plasmiidid

Plasmiid	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
pGP704L	konjugatiivne plasmiid (Amp ^R)	Pavel <i>et al.</i> , 1994
pRK2013	Abiplasmiid pGP704L konjugatsioonil	Figurski., 1979
pUX-BF13	helperplasmiid, kodeerib Tn7 transponeerumise valke (Amp ^R , mob ⁺)	Bao <i>et al.</i> , 1991
pSW(I-SceI)	I-SceI nukleaasi ekspresseeruv plasmiid, (Amp ^R)	Wong <i>et al.</i> , 2000
pJP5603-IscelV2	I-SceI saiti ja multikloneerimisjärjestust sisaldav suitsiidplasmiid, (Km ^R)	Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011
pPTS1TS2	Plasmiid pJP5603-IscelV2, kuhu on kloneeritud EcoRI ja BamHI fragmendina kokkusulatatud <i>recJ</i> geeni eelnev ja järgnev ala, (Km ^R)	Käesolevtöö
pUT18c	Konstrueeritud pUC19 põhjal, sisaldab Plac-T25-MCS järjestust (PstI–SalI–XbaI–BamHI–SmaI–KpnI–EcoRI kloneerimissaidid), (Amp ^R)	Karimova <i>et al.</i> , 2001
pKT25	Konstrueeritud pSU40 põhjal, sisaldab Plac–T25–MCS järjestust (PstI–XbaI–BamHI–SmaI–KpnI–EcoRI kloneerimissaidid), (Km ^R)	Karimova <i>et al.</i> , 2001
pUT18cImuA	pUT18c plasmiid, kuhu on kloneeritud <i>imuA</i> geen, (Amp ^R)	Käesolev töö
pUT18cImuB	pUT18c plasmiid, kuhu on kloneeritud <i>imuB</i> geen, (Amp ^R)	Käesolev töö
pUT18cDnaE2	pUT18c plasmiid, kuhu on kloneeritud <i>dnaE2</i> geen, (Amp ^R)	Käesolev töö
pUT18cDinB	pUT18c plasmiid, kuhu on kloneeritud <i>dinB</i> geen, (Amp ^R)	Käesolev töö
pUT18cDnaN	pUT18c plasmiid, kuhu on kloneeritud <i>dnaN</i> geen, (Amp ^R)	Käesolev töö
pUT18cAlkA	pUT18c plasmiid, kuhu on kloneeritud <i>alkA</i> geen, (Amp ^R)	Käesolev töö
pKT25ImuA	pKT25 plasmiid, kuhu on kloneeritud <i>imuA</i> geen, (Km ^R)	Käesolev töö
pKT25ImuB	pKT25 plasmiid, kuhu on kloneeritud <i>imuB</i> geen, (Km ^R)	Käesolev töö
pKT25DnaE2	pKT25 plasmiid, kuhu on kloneeritud <i>dnaE2</i> geen, (Km ^R)	Käesolev töö
pKT25DinB	pKT25 plasmiid, kuhu on kloneeritud <i>dinB</i> geen, (Km ^R)	Käesolev töö
pKT25DnaN	pKT25 plasmiid, kuhu on kloneeritud <i>dnaN</i> geen, (Km ^R)	Käesolev töö
pKT25AlkA	pKT25 plasmiid, kuhu on kloneeritud <i>alkA</i> geen, (Km ^R)	Käesolev töö
pUT18c-zip	Konstrueeritud pUT18c põhjal; sisaldab GCN4 pärmi valgu leutsiin zipper regiooni, positiivne kontroll, (Amp ^R)	Karimova <i>et al.</i> , 2001
pKT25zip	Konstrueeritud pKT25 põhjal; sisaldab GCN4 pärmi valgu leutsiin zipper regiooni; positiivne kontroll, (Km ^R)	Karimova <i>et al.</i> , 2001

TABEL 3. Töös kasutatud bakteritüved.

Bakteritüved	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (f80 lacZΔM15) recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
CC118λpir	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE (Am)</i>	Herrero <i>et al.</i> , 1990
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3 (rB-mB-) recA13 proΔ2 lacY1 galK2 rsp20 xyl-5 mt1-1</i>	Boyer <i>et al.</i> , 1969
BTH101	<i>F', cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Str^R), hsdR2, mcrA1, mcrB1, relA1</i>	Battesti ja Bouveret, 2012
BL21	<i>BL21</i> tüvi, konstrueeritud <i>E. coli</i> Bpõhjal, <i>F-</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>rB -</i> , <i>mB -</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i>	Stratagene
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Identne tüvega KT2440	Bayley <i>et al.</i> , 1977; Regenhardt <i>et al.</i> , 2002
PaWDnaE2	PaW85, <i>dnaE2</i> deleteeritud	Meie laboris tehtud, avaldamata
PaWDinB	PaW85, <i>dinB</i> deleteeritud	Meie laboris tehtud, avaldamata
PaWPolB	PaW85, <i>polB</i> deleteeritud	Meie laboris tehtud, avaldamata
PaWDnaE2DinB	PaW85, <i>dnaE2 dinB</i> deleteeritud	Meie laboris tehtud, avaldamata
PaWDnaE2PolB	PaW85, <i>dnaE2 polB</i> deleteeritud	Meie laboris tehtud, avaldamata
PaWDinBPolB	PaW85, <i>dinB polB</i> deleteeritud	Meie laboris tehtud, avaldamata
PaWDnaE2DinBPolB	PaW85, <i>dnaE2 dinB polB</i> deleteeritud	Meie laboris tehtud, avaldamata
PaWRecJ	PaW85, <i>recJ</i> deleteeritud	Käesolev töö
PaWDnaE2RecJ	PaW85, <i>dnaE2 recJ</i> deleteeritud	Käesolev töö
PaWDinBRecJ	PaW85, <i>dinB recJ</i> deleteeritud	Käesolev töö
PaWPolBRecJ	PaW85, <i>polB recJ</i> deleteeritud	Käesolev töö
PaWDnaE2DinBRecJ	PaW85, <i>dnaE2 dinB recJ</i> deleteeritud	Käesolev töö
PaWDnaE2PolBRecJ	PaW85, <i>dnaE2 polB recJ</i> deleteeritud	Käesolev töö
PaWDinBPolBRecJ	PaW85, <i>dinB polB recJ</i> deleteeritud	Käesolev töö
PaWDnaE2DinBPolBRecJ	PaW85, <i>dnaE2 dinB polB recJ</i> deleteeritud	Käesolev töö

TABEL 4. Töös kasutatud praimerid

Nimi	Järjestus	Lokalisatsioon
TS1r_RecJ	5' AGGCACCTGACGCTAAACGTGTTGCTTCAACCACGCT 3'	0 kuni -18 ATG strakoodonist, suunaga geenist välja
TS1f_RecJ_EcoRI	5' ATATGAATTCAACAGACTATCGCTCGGCAC 3'	-470 kuni -451 ATG startkoodonist, suunaga geeni poole
TS2r_RecJ_BamHI	5' ATATGGATCCTCTGGTCGTCGTTCCACAAG 3'	445 kuni 464 TGA stoppkoodonist, suunaga geeni sisse
TS2f_RecJ	5' GTTTAGCGTCAGGTGCCT 3'	0 kuni 18 TGA stoppkoodonist, suunaga geenist välja
RecJ_Check_Rev	5' CACGGTAATCAGCAACTGCG 3'	377 kuni 396 ATG startkoodonist, suunaga geeni alguse poole
ImuA_ylem_Xba_N d	5' ATATTCTAGATCATATGGCCGCCGTGGTCG 3'	0 kuni 17 ATG startkoodonist, suunaga geeni sisse
ImuA_alum	5' ATA TGG ATC CGG CCC AGA GCA TGG 3'	0 kuni 19 CTG stoppkoodonist, suunaga geeni sisse
ImuB_2hyb_ylem	5' ATATTCTAGATCATATGCTCTGGGCCTGCATCC 3'	0 kuni 25 ATG starkoodonist, suunaga geeni sisse
ImuB_2hyb_alumBa mH	5' ATATGGATCCATGCGAACCAACCCTGCAGC 3'	0 kuni 22 TGA stoppkoodonist, suunaga geeni sisse
DnaE2_2hyb_ylemi ne	5' ATATTCTAGATCATATGGCTGCAGGGTTGGTTC 3'	-18 kuni 0 ATG startkoodonist, suunaga geeni sisse
DnaE2_2hyb_alumi ne	5' ATA TGAATTCTTAGTGAAAATCCCGGCTGCGC 3'	20 kuni 0 TGA stoppkoodonist, suunaga geeni sisse
DnaN_2hyb_ylem	5' ATATTCTAGATCATATGCATTTACCATTTCAACGC 3'	0 kuni 18 ATG startkoodonist, suunaga geeni sisse

DnaN_2hyb_alum	5' ATATGGATCCTTACAGGCGCATCGGCATG 3'	0 kuni 19 TAA stoppkoodonist, suunaga geeni sisse.
dinB_2hyb_ylemine	5' ATATTCTAGATCATATGCACGGCGGGGCTTTCA 3'	-107 kuni -91 ATG startkoodonist, suunaga geeni alguse poole
dinB_2hyb_alumine	5' ATATGAATTCTTATTTGGGCGGAAACAGCTCCA 3'	3 kuni 22 TGA stoppkoodonist, suunaga geeni sisse
BACTH_T25_ylem	5' ATGCAGCAATCGCAT 3'	Komplementaarne T25 fragmendi algusega
BACTH_T18_ylem	5' ATGACCATGATTACGC 3'	Komplementaarne T18 fragmendi algusega
pSW-F	5'GGACGCTTCGCTGAAAAC TA'3	Komplementaarne plasmiidis pSW(I -Sce1) oleva järjestusega
pSW-R	5'AACGTCGTGACTGGGAAAAC'3	Komplementaarne plasmiidis pSW(I -Sce1) oleva järjestusega

2.2.2. PCR

PCR-i (polümeraasi ahelreaktsioon) kasutasime *P. putidaimuA*, *imuB*, *dinB*, ja *dnaE2* geenijärjestuste amplifitseerimiseks genoomist ja meie poolt tehtud konstruktide ning konstrueeritud bakteritüvede õigsuse kontrollimiseks.

Reaktsioonimaht oli 20 µl. Reaktsioonisegu sisaldas PCR-i puhvrit (10 kordse puhvri koostis oli: 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Triton X 100, 0,5% Ficoll 40, 1 mM tartrasiini); 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP-d ja 0,5 ühikut firma „Fermentas“ Taq polümeraasi. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid (10 pmol reaktsiooni kohta) on toodud Tabelis 3. PCR-i segule lisasime bakterirakke või ~10 ng isoleeritud DNA-d.

PCR-i teostasime firma “Biometra” PCR-i masinaga tingimustel: denaturatsioon 96°C 30 sekundit kuni 1 minut, praimeride seondumine 54 kuni 61°C 30 sekundit kuni 1 minut, DNA süntees 72°C juures 30 sekundit kuni 4 minutit (Saiki *et al.*, 1986). Tingimused varieerusid sõltuvalt amplifitseeritava DNA fragmendi pikkusest ja praimerite nukleotiididest järjestusest. Kokku toimus reaktsioon 25-30 tsüklit.

Geelelektroforeesiks lisasime DNA proovile 0,04%-list broomfenoolsinise lahust 50%-ses glütseroolis, 20 µl proovi kohta 4 µl. Proovid kandsime horisontaalsele 1%-sele agarosgeelile TAE puhvris (50 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA; pH 8,2). Geel sisaldas etiidiumbromiidi 0,5 µg/ml. Geelelektroforeesi viisime läbi toatemperatuuril, pingel 10-15 volti geeli sentimeetri kohta. Geeli pildistasime ultraviolettvalguses.

2.2.3. Bakterite konjugatsioon

Homoloogilise rekombinatsiooni läbiviimiseks algse ja katkestatud geeni vahel *P. putida* rakkudes kasutasime bakterite konjugatsiooni. Selleks kasvasime üleöö *E. coli* tüve CC118λpir, mis sisaldas homoloogilise rekombinatsiooni läbiviimiseks vajalikku konjugatiivset plasmidi, retsipienttüve ja plasmiidide ülekandeks vajalikku helperplasmidi RK2013 sisaldavat *E. coli* tüve HB101. Lahjendasime üleöö LB-vedelsöötmes plasmiidide selektsiooniks vajalike antibiootikumide juuresolekul kasvanud kultuurid tiheduseni $A_{580} = 0,1$ ja kasvasime loksutil ~2-3 tundi. Segasime kokku võrdse koguse (100µl) doonor-, retsipient- ja helpertüve kultuurist ja pipeteerisime 100 µl segu LB-tassile. Rakke kasvasime üleöö 30°C juures. Seejärel suspendeerisime rakukultuuri 1 ml 1 x M9 lahuses ja plaatisime sellest 20-100 µl kogused minimaal-selektiivtassidele.

2.2.4. Bakterite elektroporatsioon

E. coli rakkude elektroporatsioonil kasutasime Sharma ja Schimke (1996) meetodit. Lahjendasime üleöö LB-vedelsöötmes kasvanud bakterikultuure optilise tiheduseni $A_{580} = 0,1$, kasvasime 37°C juures loksutil ~1,5-2 tundi, kuni kultuur jõudis eksponentsiaalsesse kasvufaasi. Rakud tsentrifuugisime söötimest põhja 12100 x g 30 sekundi jooksul firma „Eppendorf“ lauatsentrifuugiga „Mini spin“ ja eemaldasime supernatandi. Seejärel pesime rakke kolm korda 10%-se glütserooliga ja suspendeerisime rakud 50 µl 10%-ses glütseroolis.

Rakkudele lisasime ligikaudu 100 ng plasmiidset DNA-d. Seejärel pipeteerisime rakud jääl jahutatud elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsiooni teostasime firma „BioRad“ elektroporaatoriga „*E. coli* Pulser“ pingel 2500 V. Pärast elektroporatsiooni lisasime rakkudele 1,5 ml LB-söödet ja kasvasime ligikaudu tund aega 37 °C juures. Seejärel tsentrifuugisime rakud põhja, suspendeerisime ligikaudu 100 µl LB-söötmes ning plaatisime selektiivsöötmele.

2.2.5. Plasmiidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutasime firma „Axygen“ kitti. Selleks kasvasime plasmidi sisaldavaid *E. coli* rakke üleöö 5 ml-s LB-söötmes plasmidi selektsiooniks vajaliku antibiootikumi juuresolekul. Tsentrifugisime rakud põhja 30 sekundi vältel ja suspendeerisime 250 µl S1 puhvris (RNAasA-d sisaldav lahus). Kõik tsentrifuugimised viisime läbi maksimumpöõretel ($12000 \times g$), kasutades firma „Eppendorf“ lauatsentrifuugi „Mini Spin“. Rakkude lüüsimiseks lisasime suspensioonile 250 µl S2 puhvrit (lüsotsüümi lahus), segasime ja hoidsime toatemperatuuril 5 minutit. Seejärel lisasime 350 µl S3 puhvrit (neutraliseeriv lahus), segasime ning tsentrifuugisime lüüsunud rakkude kestad ja kromosoom-valkkompleksi põhja 10 minuti jooksul. Järgnevalt pipeteerisime supernatandi kolonni ning tsentrifuugisime 1 minuti, mille jooksul toimus DNA seondumine kolonni maatriksile. Soolade eemaldamiseks pipeteerisime kolonni 700 µl pesupuhvrit W2 ning tsentrifuugisime 1 minuti. Seejärel elueerisime DNA 60 µl elueerimislahusega.

DNA restriksiooniks kasutasime firma “Fermentas” (Thermo Scientific) ensüüme. Reaktsioonid viisime läbi tingimustel, mis olid ette nähtud firma poolt koostatud ensüümide kataloogis.

2.2.6. *P. putida recJ* geeni suhtes defektse tüvide konstrueerimine.

P. putida recJ geeni deleteerimiseks kasutasime Posfai *et al.* (1999) ja Martinez-Garcia ja de Lorenzo (2011) põhjal modifitseeritud meetodit. Selleks amplifitseerisime *recJ* geeni 5' otsa eelse järjestuse PCR meetodil *P. putida* algse tüve kromosoomist, kasutades praimereid TS1r_RecJ, mis on komplementaarne *recJ* geeni eelse järjestusega positsioonides -18 kuni 0 ülesvoolu ATG stardikodonist ja TS1f_RecJ_EcoRI, mis on komplementaarne *recJ* geeni eelneva järjestusega positsioonides -470 kuni -451 ülesvoolu ATG stardikodonist. *recJ* geeni 3' otsale järgneva ala amplifitseerimiseks kasutasime praimereid TS2r_RecJ_BamHI (positsioonides 445 kuni 464 TGA stoppkoodonist) ja TS2f_RecJ (positsioonides 0 kuni 18 TGA stoppkoodonist). Praimer TS1r_RecJ sisaldas TS2f_RecJ praimerile komplementaarset järjestust, et sulatada järgmisel etapil kaks amplifitseeritud fragmenti kokku (*sewing* PCR). “*Sewing*” PCR reaktsiooni tegime, kasutades praimereid TS1f_RecJ_EcoRI ja TS2r_RecJ_BamHI. Selle PCR-i tulemusena saime TS1TS2 fragmendi, mille ühes otsas on EcoRI restriksioonisait ja teises BamHI restriksioonisait. Järgmises etapis lõikasime fragmenti restriksidaasidega EcoRI ja BamHI ja viisime TS1TS2 fragmendi samade

restriktaasidega avatud pJP5603-Isclv2 plasmidi, saades plasmidi pJPTS1TS2. Plasmidi pJPTS1TS2 selekteerisime *E. coli* CC118λpir tüves kanamütsiini sisaldaval selektiivsöötmele. Kontrollisime PCR-iga, kas klonimine õnnestus. Järgnevalt kasvasime plasmidi pJPTS1TS2 sisaldavaid rakke 5 ml LB vedelsöötmes üleöö 37°C ja eraldasime plasmidi, kasutades „Axygen“ kitti. Elektroporeerisime pJPTS1TS2 plasmidi *E. coli* tüve CC118λpir rakkudesse ja seejärel kasvasime pJPTS1TS2 sisaldavaid transformante 1,5 ml LB+Km vedelsöötmes temperatuuril 37°C. Lisaks kasvasime üleöö ka *E. coli* helpertüve HBRK101 (LB+Km, 37°C) ja retsipienttüve *P. putida* PaW85 (LB, 30°C). Igast üleöö kasvatatud tüve kultuurist tegime 100x lahjenduse 5 ml LB vedelsöötmesse ja kasvasime rakke 2 tundi. Seejärel võtsime 100 µl iga tüve kultuuri, segasime kokku, valasime LB tassile ja inkubeerisime üleöö temperatuuril 30°C. Järgmisel päeval kogusime LB söötmele kasvanud rakud, suspendeerisime need 1 ml M9 puhvris ning plaatisime sealt 75 µl Glc+Km selektiivtassile ja inkubeerisime üleöö temperatuuril 30°C. Kuna pJP5603 põhjal konstrueeritud plasmid pJPTS1TS2 ei ole võimeline *P. putida* rakkudes replitseeruma, said Km sisaldavale selektiivsöötmele kasvama hakata ainult kointegraadiga transkonjugandid. Kointegraadi olemasolu *P. putida* kromosoomis testisime ka PCR-ga. Edasi viisime elektroporatsiooni teel Km^r rakkudesse vektori pSW-(I-SceI), selekteerides rakke bensüülpenitsilliinil ning inkubeerisime rakke üleöö LB vedelsöötmes. See on vajalik selleks, et kromosoomist deleteerida plasmidi pJPTS1TS2 põhjal tekkinud kointegraat. Kointegraadi kadu kontrollisime paralleelkülvidega LB söötmele ja kanamütsiini sisaldavale Glc söötmele. Valisime kanamütsiini suhtes tundlikud kloonid ja kontrollisime neis homoloogilise rekombinatsiooni vahendusel toimunud *recJ* geeni asendust TS1TS2 fragmendiga PCR meetodil, kasutades primereid TS1f_RecJ_EcoRI ja RecJ_Check_Rev. Rekombinantseid kloonid kasvasime 3 passaaži LB söötmes, et vabaneda pSW(I-SceI) plasmidist ning plaatisime rakud üksikkolooniate saamiseks sobiva lahjendusega LB täissöötmele. pSW(I-SceI) plasmidist vabanemist kontrollisime paralleelkülvidega LB söötmele ja bensüülpenitseliinisisaldavale LB söötmele ning PCR-iga, kasutades primereid pSW-F ja pSW-R.

Teised *recJ* suhtes defektsed tüved olid saadud sama meetodiga, kuid retsipienttüveks olid DNA polümeraaside suhtes defektsed *P. putida* tüved (tabel 5).

2.2.7. *P. putida* Rif resistantsete mutantide tekkesageduse määramine

Spontaansete mutatsioonide tekkesageduse määramiseks kasvasime meid huvitavaid bakteritüvesid 1 ml M9-Glc-CAA minimaalsöötmes 4-6 tundi, tegime kultuuridest 10⁻⁶

lahjendused ning kasvasime rakke 2,3 ml glükoos-CAA minimaalsöötmes 20-24 tundi. Järgnevalt plaatisime igast kultuurist 500 µl rifampitsiini sisaldavale LB-tardsöötmele. Tasse inkubeerisime temperatuuril 30° C ning kolooniaid loendasime 48 tunni pärast. Üleöö kasvanud vedelkultuurides määrasime elus olevate rakude arvu. Mutatsioonisageduse arvutasime 1 ml üleöö kultuuris olevate rakkude kohta.

UV-indutseeritud mutatsioonide tekkesageduse määramiseks lahjendasime üleöö kasvanud rakukultuuri 100 korda 15 ml M9-CAA-Glc söötmesse ja kasvasime rakke 3 tundi. Seejärel võtsime 10 ml kultuuri, valasime tühjale Petri tassile ja kiiritasime lainepikkusel 254 nm doosidega 50 J/m², kasutades firma UVP (USA) aparati "UV Crosslinker CX-2000". Kiiritatud kultuuri jagasime 10 katseklaasi vahel (100 µl kultuuri 2 ml M9-CAA-Glc kohta) ja kasvasime üleöö temperatuuril 30°C. Plaatisime 0,5 ml igast kultuurist 100 µg/ml Rif sisaldavale LB tardsöötmele ja inkubeerisime temperatuuril 30° C. Tekkinud Rif^R kolooniad loendasime 48 tunni pärast.

MMC-indutseeritud mutatsioonide tekkesageduse määramiseks lahjendasime üleöö kasvanud rakukultuuri lahjendasime 100 korda 2 ml M9-CAA-Glc söötmes ja kasvasime 3 tundi (igast tüvest oli katses 3 paralleeli). Seejärel võtsime 1 ml kultuuri, lisasime 0,25 µl MMC (1mg/ml) ja jätsime üheks tunniks kasvama loksutil temperatuuril 30°C. Tunni pärast tsentrifuugisime täispööretel rakud põhja, eemaldasime supernatandi, pesime rakke 1 ml M9 puhvris, tsentrifuugisime uuesti ning suspendeerisime 1 ml M9 puhvris. Rakususpensiooni jagasime 10 katseklaasi vahel (100 µl kultuuri 2 ml M9-CAA-Glc söötme kohta) ja kasvasime üleöö temperatuuril 30°C. Järgnevalt plaatisime 0,5 ml igast kultuurist 100 µg/ml Rif sisaldavale LB tardsöötmele ja inkubeerisime temperatuuril 30°C. Selektiivsöötmele tekkinud Rif^R kolooniad loendasime 48 tunni pärast.

Selleks, et määrata kindlaks Rif^R mutantide tekkesagedus, on vajalik määrata kogu bakteripopulatsiooni rakkude arvukus. Ühes ml kultuuris elusrakkude määramiseks tegime 24 tundi kasvanud kultuurist lahjendused M9 lahuses ja plaatisime LB tassile. Tasse inkubeerisime temperatuuril 37°C.

Elusrakkude arvu määrasime vähemalt kolmest sõltumatust bakterikultuurist. Elusrakkude arvu arvutasime järgmise valemi järgi:

$$\text{Elusrakkude arv} = \frac{\text{kolooniate arv} \times \text{lahjendusfaktor}}{\text{plaaditud kogus (ml)}}$$

Iga kultuuri Rif resistentsete mutantide tekkesageduse arvutasime valemi järgi:

$$\text{Mutatsioonide tekkesagedus} = \frac{\text{Rif}^R \text{ kolooniate arv}}{\text{elusrakkude arv}}$$

Üldise mutatsioonide tekkesageduse arvutamiseks kasutasime mediaanarvutust, kus Rif^R mutantide tekkesagedus oli arvutatud 1 x 10⁹ elusraku kohta.

Tulemuste varieeruvust analüüsisime ühefaktorialse dispersioonanalüüsiga (One-Way ANOVA, *Analysis of Variance*), millele järgnes Bonferroni test (Post Hoc), leidmaks statistiliselt olulisi erinevusi tüvede vahel.

2.2.8. “Täpikatse” mutantide MMS, NQO, MNNG tolerantsuse testimiseks

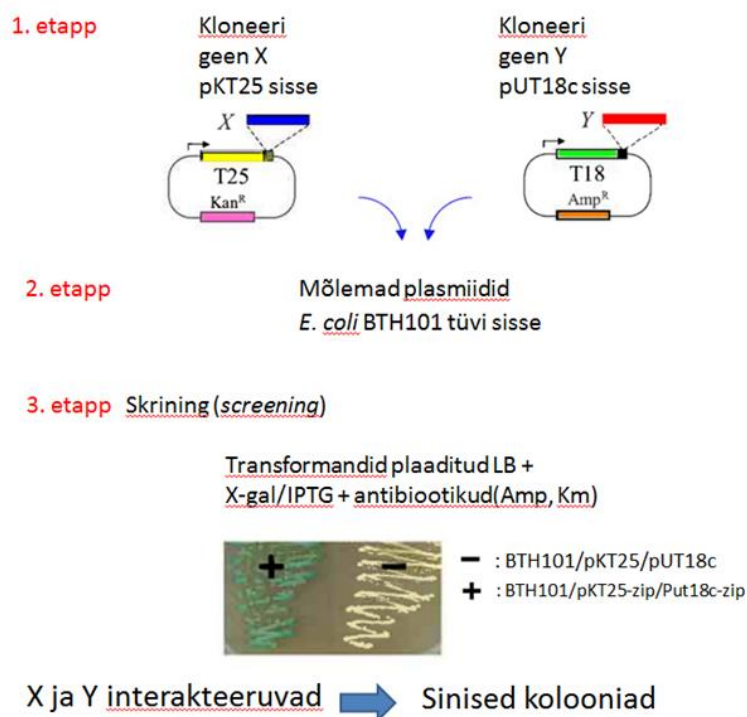
Uuritavaid *P. putida* tüvesid kasvasime üleöö 1,5 ml LB vedelsöötmes. Seejärel teostasime rakkudega nn. täpikatse, kus kõikide uuritavate tüvede üleöö kasvanud kultuuridest tegime lahjendused (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ ja 10⁻⁷) ning külvasime tilkadena (10 µl) ~10, 10², 10³, 10⁴ ja 10⁵ rakku LB tardsöötmetele, mis sisaldasid erineva kontsentratsiooniga metüülmetaansulfonaati (MMS) (2; 2,5 ja 3 mM), 4-nitrokinoliin 1-oksiid (NQO) (80, 100 ja 120 µM) ja N-metüül-N'-nitro-N-nitrosoguanidiin (MNNG) (30 ja 40 µM). Kontrolliks külvasime lahjenduste read ka LB tassidele, kuhu mutageenseid kemikaale ei olnud lisatud. Võrdlesime erinevate tüvede kasvu MMS-i või MMC juuresolekul ja ilma kahe päeva jooksul pärast rakkude külve.

2.2.10. Bakteri adenülaadi tsüklaasi aktiivsusel põhinev kaksikhübriid süsteem (BACTH)

Bakteri adenülaadi tsüklaasi aktiivsusel põhinev kaksikhübriid süsteem (ingl. k. *Bacterial Adenylate Cyclase-based Two-Hybrid*, BACTH) on välja töötatud valk-valk interaktsioonide uurimiseks *in vivo* (Karimova *et al.*, 1998). Adenülaadi tsüklaas katalüüsib cAMP sünteesi ATP-st. Süsteem põhineb sellel, et *Bordetella pertussis* adenülaadi tsüklaasi (CyaA) katalüütiline domään koosneb kahest komplementaarsest fragmendist T18 ja T25. Nad on aktiivsed ainult kompleksis üksteisega. Kui kaks valku (X ja Y), mis interakteeruvad omavahel, on liidetud CyaA fragmentidega T18 ja T25 (T18+X ja T25+Y), siis taastab selline

heterodimerisatsioon CyaA funktsionaalsuse, mille tagajärjel suureneb cAMP tase rakus. cAMP seondub kataboliitse repressiooni aktivaatorvalguga CAP (ingl. k. *Catabolite Activator Protein*, CAP). cAMP/CAP kompleks aktiveerib *lac* operoni, mis osaleb laktoosi metabolismis, mille tagajärjelvärvuvad *E. coli* rakud X-Gal-i sisaldaval söötmel siniseks. Eksperimendiskeem on näidatud joonisel 4.

Valkudevaheliste interaktsioonide uurimiseks BACTH süsteemiabilliitsime uuritavad valgud CyaA valgu T18 ja T25 fragmentideganing ekspresseerisime konstrueeritud liitvalke koos *E. coli* adenülaadi tsüklaasi defektses tüves (*E. coli cya*, käesolevas töös kasutasime selleks *E. coli* tüve BTH101). Liitvalkude konstrueerimiseks kasutasime T18 järjestust kodeerivat plasmiidipUT18c ja T25 järjestust kodeerivat plasmidi pKT25. Liitvalgud konstrueerisime valkude ImuA, ImuB, DnaE2, DnaN ja DinB puhul, viies nende geenid plasmiididesse pUT18c ja pKT25, kasutades restriктаasi saite (tabel 5). Seejärel viisime liitvalke ekspresseerivad konstruktid CyaA-defektsesse tüvesse BTH101 transformatsiooni teel. Kotransformatsiooni saamiseks plaatisime rakud LB/Amp/Km tassile ja inkubeerisime 48 tundi temperatuuril 30°C. Igalt selektiivtassilt valisime 3 kolooniat, milles oli eelnevalt PCR teel kindlaks tehtud mõlema liitvalgu konstrukti olemasoluning külvisime neist kolooniatest rakke 3 ml LB/Amp/Km/0,5 mM IPTG vedelsöötmesse. Kasvatasime rakke üleöö temperatuuril 30°C. Uuritavate valkude vaheliste interaktsioonide tuvastamiseks külvasime üleöö kasvanud kultuuridest 2 µl rakke tilkadena LB/X-Gal/IPTG/Amp/Km tassidele ja inkubeerisime kuni 48 tundi. Kui valgud interakteerusid, siis kolooniad muutusid siniseks. Positiivse kontrollina kasutasime liitvalkude konstrukte pUT18c-zip ja pKT25-zip. Negatiivseks kontrolliks olid plasmiidid pUT18c ja pKT25, mis sisaldasid ainult T18 ja T25 fragmente kodeerivaid järjestusi.



Joonis 4. BACTH testsüsteemi eksperimentiskeem. 1. etappil kloneeritakse uuritavad geenid vektorite sisse. 2. etappil kotransformeeritakse geenisisaldavaid vektoreid *E. coli* BTH101 tüve sisse. 3. etappil selekteeritakse interakteeruvate valke kombinatsioone LB/X-gal/IPTG/Amp/Km tassidel. Kui valgud interakteeruvad omavahel, siis tekkivad sinised kolooniad (joonis tehtud EUROMEDEX protokoll järgi).

Tabel 5. Liitvalkude konstrueerimisel kasutatud restriктаasi saite.

Geen/vektor	pUT18c	pKT25
<i>imuA</i>	XbaI/BamHI	XbaI/BamHI
<i>imuB</i>	XbaI/EcoRI	XbaI/SmaI
<i>dnaE2</i>	XbaI/BamHI	XbaI/BamHI
<i>dinB</i>	XbaI/EcoRI	XbaI/SmaI
<i>dnaN</i>	XbaI/BamHI	XbaI/BamHI

3. Tulemused ja arutelu

3.1 *P. putida* „Mutageensuse“ operoni valkude vahelist interaktsioonide määramine *in vivo*

Warner *et al.* (2010) uurisid bakteri *M. tuberculosis* (Mtb) „mutageensuse“ operoni kuluvate valkude (ImuA', ImuB, DnaE2) omavahelisi interaktsioone *in vivo*. Samuti vaatasid nad „mutageensuse“ operoni valkude seondumist protsessiivsuse faktoriga β -klambriga. β -klamber on oluline replisoomi komponent, mis seob DNA polümeraasi DNA-le ja tagab kõrge protsessiivsuse DNA sünteesil. Kirjandusest on teada, et β -klambriga seonduvad kõik DNA polümeraasid (nii replikatiivsed, kui ka spetsialiseerunud) ja ta on tsentraalne platvorm, kuhu seonduvad TLS polümeraasid selleks, et pääseda ligi DNA kahjustusele ja osaleda DNA replikatsioonil.

Selgus, et Mtb ImuB seondub ImuA'-ga, ImuB-ga, DnaE2-ga, β -klambriga, ning replikatiivse DNA polümeraasi katalüütilise subühikuga DnaE1. Nende andmete põhjal pakkusid Warner *et al.* (2010) välja mudeli, kus ImuA' seondub DNA-ga ja ImuB-ga, DnaE2 aga omakorda seondub ImuB kaudu β -klambriga ning katalüüsib TLS-i (joonis 3).

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida *P. putida* „mutageensuse“ operoni valkude omavahelist interaktsiooni *in vivo*. Lisaks testisime „mutageensuse“ operoni ja spetsialiseerunud DNA polümeraasi IV (DinB) interaktsioone β -klambriga (DnaN homodimeer). Selleks kasutasime bakteri kaksikübriidset testsüsteemi BACTH, mis põhineb adenülaadi tsüklaasi aktiivsuse testimisel *lacZ* geeni aktivatsiooni kaudu. Uuritavad geenid (*imuA*, *imuB*, *dnaE2*, *dinB*, *dnaN*) kloneerisime mõlema vektori pUT18c ja pKT25 adenülaadi tsüklaasi valgu fragmente T18 ja T25 kodeerivate järjestustega samasse lugemisraami ja kotransformeerisime kõik võimalikud valkude kombinatsioonid *E. coli* BTH101 rakkudesse (vt. „Materjal ja meetoodika“ peatükki detailsema informatsiooni osas). Valkude interaktsioone määrasime X-gal ja IPTG sisaldaval selektiivtassil. Meie katse tulemused viitasid sellele, et ImuA seondub iseendaga ja ImuB-ga, ImuB seondub samuti iseendaga ja ka DinB-ga, DnaE2 seondub DnaN-ga kuid mitte Imu valkudega. Kinnitust leidis see, et DnaN interakteerub iseendaga. Testi tulemused on summeeritud tabelis 6.

Tabel 6. „Mutageensuse“ operoni valkude interaktsioonid. ✓ tähistab interaktsiooni toimumist, ✕- mittetoimumist.

	ImuA	ImuB	DnaE2	DinB	DnaN
ImuA	✓	✓	✕	✕	✕
ImuB	✓	✓	✕	✓	✕
DnaE2	✕	✕	✕	✕	✓
DinB	✕	✓	✕	✕	✕
DnaN	✕	✕	✓	✕	✓

Käesolevas töös saadud tulemused erinevad Warner *et al.* (2010) artiklis avaldatud tulemustest. Võimalik, et tulemuste erinevus on põhjustatud meetodi valikust: Mtb puhul kasutati pärmi kaksikhübriidset testsüsteemi ja meie kasutasime bakteri kaksikhübriidset testsüsteemi. Käesolevas töös saadud tulemuste põhjal *P. putida* ImuB ei seonu ei β -klambriga ega DnaE2-ga. Seega ei saa tal olla tsentraalne roll „mutageensuse“ operoni kompleksi moodustamisel. Kas ImuA seondub DNA-ga või mitte, jääb hetkel ebaselgeks, kuna puuduvad andmed selle kohta. Tasub mainida, et bioinformaatiline analüüs viitab sellele, et ImuA on RecA homoloog ja tal on konserveerunud positsioonid DNA-ga seondumismotiivis. Märkamisväärne on see, et DnaE2 interakteerub otse β -klambriga, kuid mitte ImuA ega ImuB-ga. Seega ei kehti siin ka Warner *et al.* (2010) poolt esitatud „mutasoomi“ töö mudel. Saadud tulemused viitavad sellele, et DnaE2 ei vaja ImuA ja ImuB valke β -klambriga seondumiseks. Samas meie labori avaldamata andmed viitavad sellele, et kõik „mutageensuse“ operoni kompinendid on vajalikud tema korrektseks tööks. Seega ImuA ja ImuB valkude roll võib olla kaudsemalt seotud DnaE2 stabiilsusega. Näiteks võib ImuA seonduda ssDNA-ga ja stabiliseerida seda, kuna ImuA sarnaneb ssDNA-ga seonduva valguga RecA.

3.2 Spetsialiseerunud DNA polümeraaside osalus spontaansete mutatsioonide tekkel *recJ* defektsetel tüvedel

Spontaansed mutatsioonid tekkivad rakus pidevalt. Neid põhjustab vale nukleotiidi inkorporeerumine replikatiivsete DNA polümeraaside poolt DNA sünteesil. Lisaks põhjustavad metabolismi käigus tekkinud kõrvalproduktid (nt. ROS ja alküleerivad ühendid) DNA kahjustusi, mille tagajärjel võivad esineda mutatsioonid. Kui neid kahjustusi ei paranda, toimub kahjustatud kohast TLS spetsialiseerud DNA polümeraaside abil ja sõltuvalt

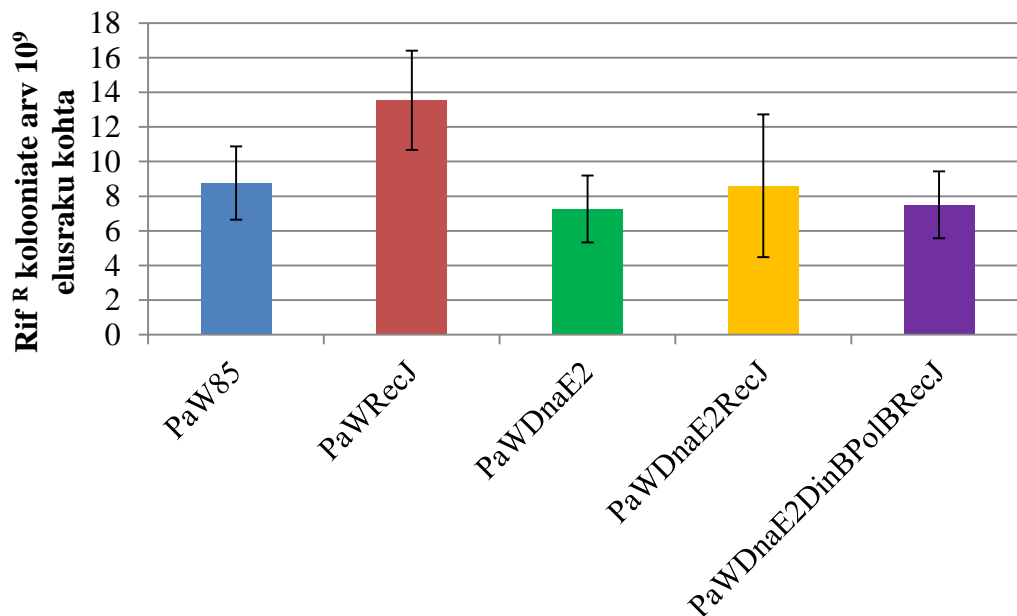
kahjustuse tüübist ja polümeraasist võib see toimuda kas täpselt või vigaselt (Nohmi, 2006; Fijalkowska *et al.*, 2012).

Selleks, et uurida „mutageensuse“ operoni rolli mutatsiooniprotsessides *recJ* puudumisel konstrueerisime järgmised tüved:

1. PaWRecJ (*recJ*);
2. PaWDnaE2RecJ (*dnaE2 recJ*);
3. PaWDinBRecJ (*dinB recJ*);
4. PaWPolBRecJ (*polB recJ*);
5. PaWDnaE2DinBRecJ (*dnaE2 dinB recJ*);
6. PaWDnaE2PolBRecJ (*dnaE2 polB recJ*);
7. PaWDinBPolBRecJ (*dinB polB recJ*);
8. PaWDnaE2DinBPolBRecJ (*dnaE2 dinB polB recJ*).

Meie labori avaldamata andmed näitavad, et kõik „mutageensuse“ operoni geenid osalevad ühes DNA kahjustuste tolereerimisrajas ja on olulised tema tööks, ja kirjandusest on teada, et DnaE2 viib läbi TLS-i ja on spetsialiseerunud DNA polümeeraas. Seepärast operoni mõju uurimiseks kasutasime *dnaE2* geeni suhtes defektset tüve.

Kõigepealt selgitasime, kuidas mõjutab *recJ* puudumine spontaansete mutatsioonide tekkesagedust erinevate DNA polümeraaside suhtes defektsetes tüvedes. Selleks valisime 5 tüve: PaW85 (metsik-tüüp), PaWRecJ (puudub *recJ*), PaWDnaE2 (puudub *dnaE2*), PaWDnaE2RecJ (puuduvad *dnaE2* ja *recJ*) ja PaWDnaE2DinBPolBRecJ (puuduvad *dnaE2*, *dinB*, *polB* ja *recJ*). Spontaansete mutatsioonide tekkesagedust määrasime, kasutades rifampitsiini resistentsusel baseeruvat testsüsteemi (Garibyan *et al.*, 2003; Jatsenko *et al.*, 2010).



Joonis 5. Spontaansete mutatsioonide tekkesagedus. Spontaansete Rif^R mutantide teke 1x10⁹ raku kohta *P. putida* tüvedes PaW85, PaWRecJ, PaWDnaE2, PaWDnaE2RecJ, PaWDnaE2DinBPolBRecJ. Esitatud on 30 sõltumatu paralleelkatse keskmised ja keskväärtuste 95%-lised usalduspiirid. Tulemuste varieeruvust analüüsisime ühefaktoriaalse dispersioonanalüüsiga *One-way* ANOVA, millele järgnes Bonferroni test (Post Hoc) ($p < 0,05$).

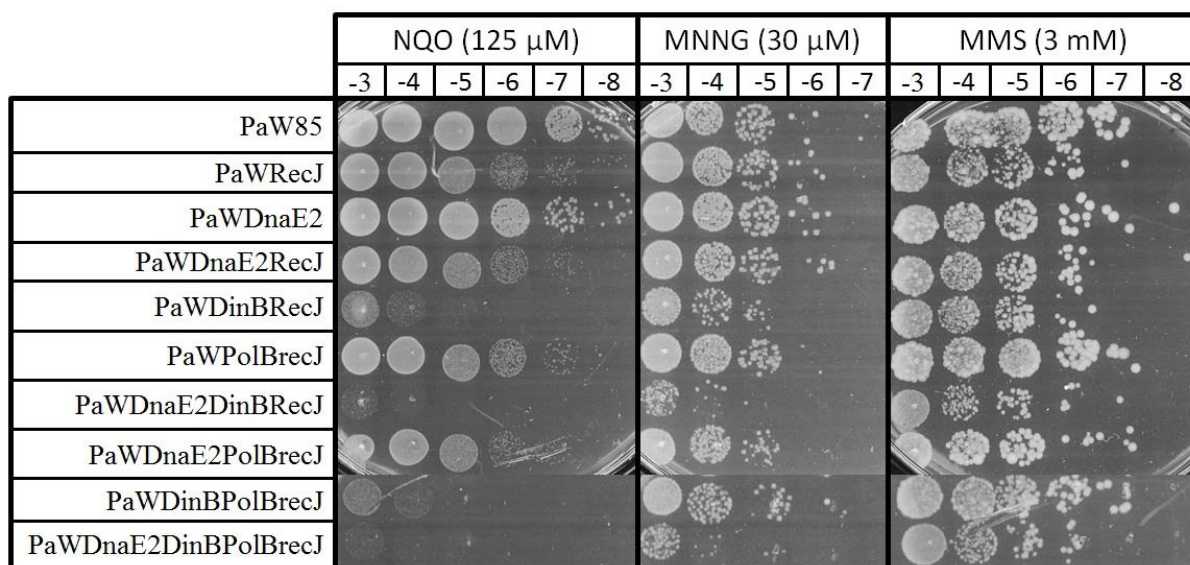
Joonisel 5 on summeeritud kolme sõltumatu katse tulemused. Me ei näinud konstrueeritud deletsioontüvede puhul erinevusi spontaansete mutatsioonide tekkesageduses võrreldes metsiktüvega PaW85. *recJ* suhtes defektse tüve (PaWRecJ) puhul oli aga mutatsioonisagedus kõrgem võrreldes tüvede PaWDnaE2 ja PaWDnaE2DinBPolBRecJ mutatsioonisagedusega ($p = 0,01$). Samas PaWRecJ ja PaWDnaE2RecJ tüvede vahel ei esinenud statistiliselt olulist erinevust, kuigi võib see olla tingitud tulemuste kõikumisega ($p = 0,09$). Saadud tulemused näitavad, et *recJ* puudumisel suureneb mutatsioonide arv, kuid nende arv väheneb DnaE2 ja teiste spetsialiseerunud DNA polümeraaside puudumisel. Mutatsioonisageduse langus tüvede PaWDnaE2RecJ ja PaWDnaE2DinBPolBRecJ puhul võib olla tingitud sellest, et TLS polümeraaside puudumisel valib rakk veavaba DNA parandamise, mistõttu väheneb mutatsiooni tekkesagedus.

3.3 Eksogeenseid DNA kahjustusi põhjustavate kemikaalide mõju *recJ* ja spetsialiseerunud DNA polümeraaside defektsetele tüvedele

Kemikaalid, mis kahjustavad DNA-d, põhjustavad replikatsiooni peatumist. Replikatsiooni peatumine on rakudele eluohtlik, mistõttu selle taastamine on hädavajalik. Replikatsiooni

jätkamiseks on kaks strateegiat: parandada kahjustus (NER, BER, homologiline ja mittehologiline rekombinatsioon) või ületada see (TLS). Bakteris *E. coli* on näidatud, et RecJ mängib olulist rolli raku valiku tegemisel ja eelistab DNA reparatsiooni.

Sellest informatsioonist lähtudes oli üheks töö eesmärgiks uurida ka seda, kuidas taluvad erinevaid DNA kahjustavaid kemikaale RecJ ja spetsialiseerunud DNA polümeraaside suhtes defektsed tüved. Pilootkatsetes selgus, et ROS-i tekitavad kemikaalid (paraquaat ja H₂O₂) ei mõjuta käesoleva töös kasutatud mutantide elumust (tulemused ei ole toodud). Lisaks testisime 3 kemikaali mõju: 4-nitrokinoliin-N-oksiid (NQO), N-metüül-N'-nitro-N-nitrosoguanidiin (MNNG) ja metüülmetaan sulfonaat (MMS). NQO tekitab kaheaahelisi katkeid DNA-s ja struktuurseid muutusi (*G-adducts*). MNNG põhjustab nii *N*- kui ka *O*-metüülatsiooni DNA-s. MMS põhjustab 1-metüüladeniini (1-meA) ja 3-metüülsütosiini (3-meC) teket. Katsetulemused on summeeritud joonisel 8.



Joonis 8. Metsiktüve (PaW85) ja deletsioonitüvede DNA kahjustavatele kemikaalidele taluvuse võrdlus. Joonise ülaosas on märgitud, mis kemikaaliga ja kontsentratsiooniga LB tassile oli tüved külvatud. Kemikaale sisaldavatele LB tassidele oli tilgutatud 10 µl üleöö kultuuri lahjendusest, mille lahjendustegur on märgitud joonise kohale. Kõigi tüvede puhul oli katses võrdne kogus rakke. Tassid olid inkubeeritud 24 tundi temperatuuril 30°C ja pildistatud. MMS-i puhul oli inkubatsiooniperiood 48 tundi.

Selgus, et *recJ* defektsed tüved taluvad NQO kehvemini võrreldes metsiküvega (PaW85). Defektse *dinB* geeniga mutantidel (PaWDinBRecJ, PaWDnaE2DinBRecJ, PaWDnaE2DinBPolBrecJ) on NQO taluvus praktiliselt nullis töös kasutatud kontsentratsiooni puhul. *dnaE2* ja *recJ* defektsel (PaWDnaE2RecJ) ja *polB* ja *recJ* defektsel (PaWPolBrecJ) kaksikmutandil on NQO taluvus võrreldav *recJ* defektse üksikmutandiga (PaWRecJ). Ainult *dinB* ja *recJ* puudumisel (PaWDinBRecJ) on NQO taluvus parem võrreldes *dnaE2*, *dinB*, *recJ*

puudumisega (PaWDnaE2DinBRecJ). *dnaE2* puudumisel (PaWDnaE2) on taluvus võrreldav metsiktüübiga. Seega RecJ puudumisel võib sõltuda NQO poolt põhjustatud kahjustuste ületamine erinevatest TLS polümeraasidest. DinB (Pol IV) on sel juhul peamine kasutatav TLS DNA polümeraas (Ipilliti *et al.*, 2012). DinB (Pol IV) puudumisel ületab aga ka DnaE2 neid kahjustusi, mispärast DnaE2-t saab nimetada varu TLS DNA polümeraasiks. Samas PolB (Pol II) ei osale NQO poolt põhjustatud kahjustuste ületamisel.

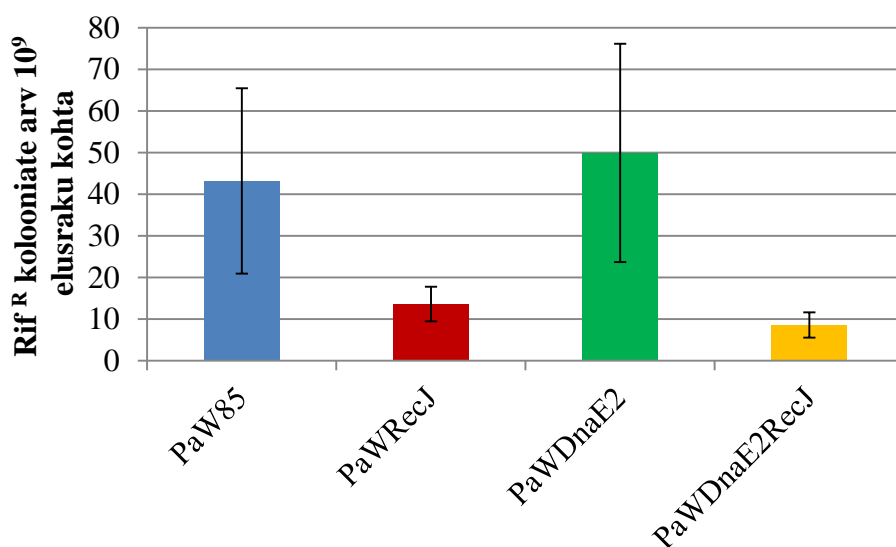
MNNG puhul ei sõltu rakkude taluvus *recJ* geenist, kuid väheneb *dinB* puudumisel. PaWDnaE2DinBRecJ talub MNNG-d kehvemini võrreldes tüvega PaWDinBRecJ. Seega DnaE2 ületab MNNG-ga tekkitud kahjustusi DinB puudumisel. *polB* ja *recJ* defektse tüve (PaWPolBRecJ) kasv on võrreldav metsik-tüübiga, seega PolB (Pol II) ei osale ka MNNG poolt põhjustatud kahjustuste ületamisel.

recJ defektsed tüved taluvad MMS kehvemini võrreldes metsik-tüübiga (PaW85). DinB (Pol IV) puudumisel taluvad rakud kehvemini MMS-i, seega on ta vajalik MMS-ga tekkinud kahjustuste efektiivseks ületamiseks. Ainult *dnaE2* puudumisel (PaWDnaE2) taluvad rakud MMS-i võrreldavalt metsiktüübiga, kuid *dnaE2*, *dinB* ja *recJ* puudumisel (PaWDnaE2DinBRecJ) kasvavad rakud halvemini võrreldes ainult *dinB* ja *recJ* puudumisega (PaWDinBRecJ). Seega DinB puudumisel on DnaE2 oluline TLS-is ka MMS-indutseeritud kahjustuste korral.

DNA-d kahjustavate kemikaalide suhtes taluvuskatsete tulemusi saab kokku võtta järgnevalt. *recJ* puudumisel kasvavad rakud kehvemini võrreldes metsik-tüübiga NQO või MMS sisaldavatel tassidel, kuigi MNNG taluvus ei sõltu *recJ* geenist. Kõik kasutatud kemikaalid võivad põhjustada DNA ahela katkete teket (nii tühimikke, kui ka katkeid). DNA ahela katkeid parandatakse, kasutades homoloogilist rekombinatsiooni (RecBCD ja RecFOR rajad), kus RecJ omab olulist rolli RecFOR reparatsioonirajas. Seega RecJ puudumisel kasvavad rakud kehvemini kemikaali juuresolekus, kuna üks kahest reparatsiooni rajast ei tööta. *dinB* defektsete tüvede puhul kõikide kasutatud kemikaalide taluvus oli vähenenud, mis viitab DinB (Pol IV) tähtsusele nende kemikaalide poolt tekitatud kahjustuste ületamisel. Need tulemused langevad kokku bakteris *E. coli* saadud tulemustega (Kumari *et al.*, 2008). Kuna PaWDinBRecJ kasvab NQO, MNNG või MMS juuresolekul paremini kui PaWDnaE2DinBRecJ, paljastab DinB ja RecJ koospuudumine „mutageensuse“ operoni rolli nende kahjustuste ületamisel või reparatsioonil. Seepärast saab DnaE2 nimetada varu TLS DNA polümeraasiks. Samas PolB (Pol II) ei osale bakteris *P. putida* NQO, MNNG ja MMS-ga indutseeritud DNA kahjustuste ületamisel.

3.4 „Mutageensuse“ operoni osalus UV-indutseeritud mutageneesis *recJ* defektsetel tüvedel

UV kahjustuste puhul rakkude ellujäämist bakteris *E. coli* suurendab Pol V, kuid mitte Pol IV või Pol II ja vastutab UV-indutseeritud mutageneesi eest. Kehtiva hüpoteesi järgi täidab „mutageensuse“ operon bakterites Pol V sarnast funktsiooni. Samas teistes bakterites *C. crescentus* ja *M. tuberculosis* (Galhardo *et al.*, 2005; Warner *et al.*, 2010), kus oli uuritud „mutageensuse“ operon, olid *dnaE2* ja teiste operoni komponentide suhtes defektsed tüved UV-kiirguse tundlikumad ja neil puudus UV-indutseeritud mutageenes. Bakteris *E. coli* on *recJ* geen hädavajalik efektiivseks DNA replikatsiooni taastamiseks. *recJ* puudumisel DNA replikatsiooni taastamine ja raku ellujäämine sõltub ainult Pol V tööst ning sellega kaasneb UV-indutseeritud mutageenes (Courcelle *et al.*, 2006). Käesolevas töös selgitasime, kas DnaE2 osaleb UV-indutseeritud mutageneesis, kuidas mõjutab *recJ* UV-indutseeritud mutageneesi ja kas tema puudumine paljastab DnaE2 osaluse UV-indutseeritud mutageneesis. Tulemused on summeeritud joonisel 6.



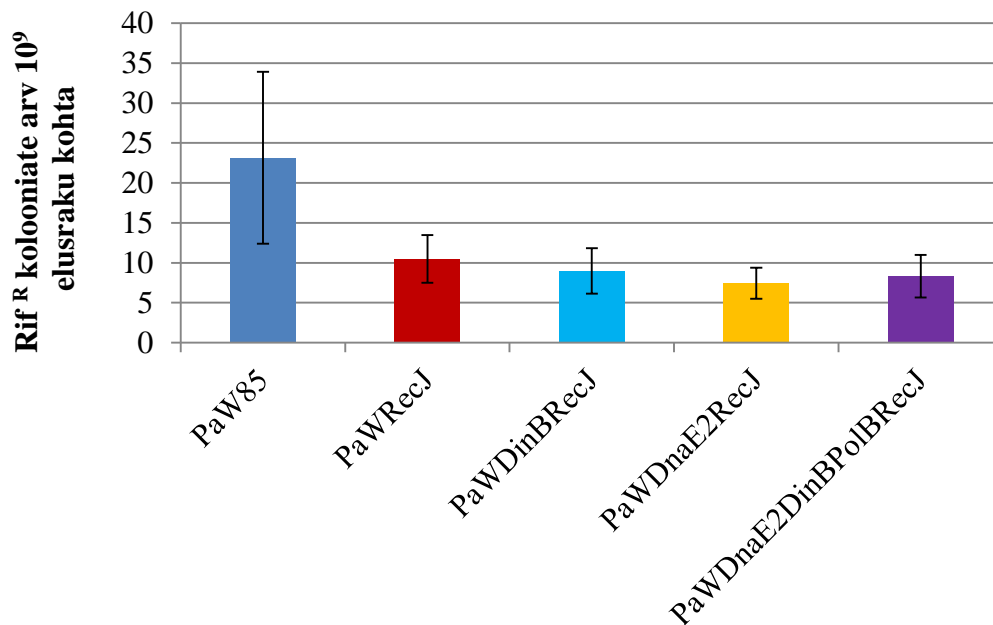
Joonis 6. UV-indutseeritud mutatsioonide tekkesagedus. Rif^R mutantide teke 1×10^9 raku kohta *P. putida* tüvedes PaW85, PaWRecJ, PaWDnaE2, PaWDnaE2RecJ. Rakud olid kiiratud lainepikkusega 254 nm doosiga 50 J/m^2 . Esitatud on 30 sõltumatu paralleelkatse keskmised ja keskvaartuste 95%-lised usalduspiirid. Tulemuste varieeruvust analüüsisime ühefaktoriaalse dispersioonanalüüsiga One-way ANOVA, millele järgnes Bonferroni test (Post Hoc) ($p < 0,05$).

Katsetest selgus, et metsiktüve (PaW85) ja PaWDnaE2 mutatsioonisagedused ei erine omavahel, kuid mõlemad erinevad PaWRecJ ja PaWDnaE2RecJ tüvede

mutatsioonisagedusest. Tüvede PaWRecJ ja PaWdNaE2RecJ puhul on tekkinud Rif^R mutantide arv väiksem võrreldes metsiktüvega ($p=0,02$ ja $p=0,03$ vastavalt). Seega *recJ* puudumisel väheneb UV-indutseeritud mutatsioonisagedus. Kuna tüvede PaWRecJ ja PaWRecJDnaE2 mutatsioonisagedused sarnanevad omavahel, viitab see sellele, et DnaE2 ei osale UV-indutseeritud mutageneesil *P. putida* rakkudes. Saadud tulemus erineb *E. coli*-s saadud tulemustest, kus *recJ* puudumisel suurenes mutatsioonide arv ja Pol V puudumisel mutatsioonisagedus lähenes nullile (Courcelle *et al.*, 2006). Erinevused võrreldes *E. coli*'ga võivad olla tingitud sellest, et *recJ* puudumist suudab kompenseerida mõni teine eksonukleaaas või UV-indutseeritud kahjustuste eemaldamisel osalevad *P. putida* rakkudes teised reparatsioonisüsteemid (NER, RecBCD rekombinatsioonirada).

3.5 „Mutageensuse“ operoni osalus MMC-indutseeritud mutageneesil *recJ* defektsetel tüvedel

MMC tekitab DNAs ahelavahelisi ristsidemeid (*interstrand crosslinks*) ja kaksikahelalise DNA katkeid (DSB) ja peatab sellega DNA sünteesi. Kui neid kahjustusi ei parandata, võivad nad põhjustada mutatsioone või raku surma. Bakterites *C. crescentus* ja *M. tuberculosis* olid „mutageensuse“ operoni geenide suhtes defektsed tüved MMC tundlikud ja neil puudus MMC-indutseeritud mutagenees (Galhardo *et al.*, 2005; Warner *et al.*, 2010). Neist tulemustest lähtudes tekkis küsimus, kas samasugune efekt ilmneb ka *P. putida* rakkudel. Kemikaalide tundlikkuse katse tulemused näitasid, et ainult TLS DNA polümeraaside suhtes defektsetel tüvedel puudus efekt, kuid see ilmnis *recJ* puudumisel. Seega oli katse eesmärgiks uurida *recJ* ja spetsialiseerunud DNA polümeraaside mõju MMC-indutseeritud mutageneesile. Tulemused on summeeritud joonisel 7.



Joonis 7. MMC-indutseeritud mutatsioonide tekkesagedus. Rif^R mutantide teke 1×10^9 raku kohta *P. putida* tüvedes PaW85, PaWRecJ, PaWDinBRecJ, PaWDnaE2RecJ, PaWDnaE2DinBPoIBRecJ. MMC lõppkontsentratsioon oli 0,25 µg/ml. Esitatud on 30 sõltumatu paralleelkatse keskmised ja keskväärtuste 95%-lised usalduspiirid. Tulemuste varieeruvust analüüsisime ühefaktoriaalse dispersioonanalüüsiga *One-way* ANOVA, millele järgnes Bonferroni test (Post Hoc) ($p < 0,05$).

Metsiktüves PaW85 on mutatsioonisagedus kõrgem võrreldes kõikide teiste tüvedega. Seega *recJ* puudumisel väheneb MMC-st indukseeritud mutatsioonide tekkesagedus. Tüvedel PaWRecJ, PaWDinBRecJ, PaWDnaE2RecJ, PaWDnaE2DinBPoIBRecJ on mutatsioonisagedused omavahel sarnased. Seega DnaE2, DinB või nende mõlemate DNA polümeraaside puudumisel ei suurene ega vähene mutatsioonisagedus võrreldes ainult *recJ* suhtes defektse tüvega. See näitab, et *recJ* defektsetel tüvedel elimineeritakse MMC-indutseeritud kahjustusi reparatsioonisüsteemide poolt.

3.6 „Mutageensuse“ operoni roll *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides

„Mutageensuse“ operon koosneb *P. putida* rakkudes neljast geenist: operoni negatiivsest regulaatorist geenist *lexA2*, *recA* geeni homologist *imuA*, Y-perekonna DNA polümeraasi geeni homologist *imuB* ja DNA polümeraasi III α-subühikust geeni homologist *dnaE2*. Selline operon on laialt levinud proteobakterites ja ta leidub bakterites, kus puuduvad *E. coli* DNA Pol V homologid. Seega arvatakse, et nad võivad täita Pol V sarnast funktsiooni ja osaleda TLS-is. Varem tehtud uuringud bakteris *M. tuberculosis* näitasid, et DnaE2 on DNA

polümeraas, mis suudab läbi viia TLS-i ja kõik operoni poolt kodeeritud valgud on olulised tema tööks (Warner *et al.*, 2010). Lisaks näidati nende bakterite puhul, et spontaansete mutatsioonide tekkesagedus metsik-tüübil ja *dnaE2* defektsel tüvel on omavahel võrreldavad, kuid UV-indutseeritud mutageneesi puhul väheneb *dnaE2* defektsel tüvel mutatsioonisagedus mitu korda võrreldes metsik-tüübiga (Galhardo *et al.*, 2005; Warner *et al.*, 2010). Sama efekt säilis ka MMC-indutseeritud mutageneesi puhul (Galhardo *et al.*, 2005). Sellest lähtuvalt tehti järeldust, et „mutageensuse“ operon vastutab nendes bakterites UV- ja MMC-indutseeritud mutageneesi eest, mis bakteris *E. coli* sõltub DNA polümeraasist Pol V. Nii ei pruugi see olla aga bakteris *P. putida*. Käesoleva töö tulemused näitavad, et UV- ja MMC-indutseeritud mutageneesi puhul on *dnaE2* puudumisel mutatsioonide tekkesagedus võrreldav metsiktüve mutatsioonisagedusega. Siin jääb ebaselgeks, kas *P. putida* „mutageensuse“ operon ei osale UV- ja MMC-indutseeritud mutageneesil või tema puudust kompenseerib *recJ* olemasolu.

Courcelle *et al.* (2006) näitasid, et RecJ on oluline DNA replikatsiooni taastamiseks kahjustuse kohalt ja tema olemasolul eelistab rakk DNA kahjustuse parandamist reparatsioonisüsteemide poolt TLS-i asemel. Nende poolt pakutud hüpoteesi järgi peaks suurenema *recJ* defektsel tüvel UV-indutseeritud mutatsioonide tekkesagedus, sest *recJ* puudumisel sõltub UV-indutseeritud DNA kahjustuste ületamine ainult DNA Pol V tööst. Nende hüpotees leidis kinnitust ka eksperimentaalselt. Tõepoolest, *recJ* defektsel tüvel oli indutseeritud mutatsioonide tekkesagedus mitu korda kõrgem võrreldes metsik-tüübiga, Pol V defektsel ja *recJ* ja Pol V topeltdefektsel tüvedel lähenes indutseeritud mutatsioonisagedus aga nullile. Samas ei esinenud olulisi erinevusi, kui võrreldi spontaanset mutatsioonisagedust.

Käesolevas töös saadud tulemused erinevad neist, mis on saadud *E. coli* *recJ* defektse tüvega. Kõigepealt, *recJ* geeni puudumisel väheneb (mitte suureneb) mutatsioonide tekkesagedus UV-indutseeritud mutageneesi puhul. *dnaE2* puudumisel sarnaneb indutseeritud mutatsioonide tekkesagedus metsiktüve omaga, *dnaE2* ja *recJ* topeltdefektsel tüvel sarnaneb indutseeritud mutatsioonide tekkesagedus *recJ* defektse üksikmutandiga. Seega esineb *P. putida* *recJ* geenil vastupidine efekt võrreldes *E. coli* *recJ* geeniga. Tundub, et *P. putida* RecJ mõju on UV kiirgusest põhjustatud DNA kahjustuste korral hoopis mutageenne. Siin tekitab küsimus, kas Courcelle *et al.* (1999) poolt pakutud mudel kehtib. Kui jah, siis kas siin on tegemist hoopis vastupidise efektiga (eelistatakse TLS-i). Kui ei, siis miks *recJ* puudumisel väheneb mutatsioonide tekkesagedus? Nendele küsimustele vastamiseks on kindlasti vaja lisauuringuid. Praeguste katsetulemuste põhjal saab väita, et bakteris *P. putida* ei osale „mutageensuse“ operon ei UV- ega MMC-indutseeritud mutageneesil. „Mutageensuse“ operoni roll tuleb esile DinB defektsel tüvel NQO, MNNG ja MMS juuresolekul. Selle põhjal

võiks arvata, et „mutageensuse“ operon osaleb alküleeritud lämmastikaluste ja N-aduktide, kuid mitte CPD ja dsDNA katkete tolereerimises. Ka siin on vaja lisauuringuid, et selgitada, mis kahjustuste tüüpe ületab DnaE2 ja kuidas ta töötab. Imu ja DnaE2 valkude vaheliste interaktsioonide kindlaks tegemine oleks siinkohal hea alus „mutasoomi“ töö kindlaks tegemiseks.

DNA kahjustusi põhjustavate kemikaalide taluvuse katsete tulemustest selgus, et DnaE2 suurendab DNA-d alküleerivate kemikaalide taluvust DNA Pol IV (DinB) defektsetel tüvedel. Seega on võimalik, et Pol IV puudumisel sünteesib DnaE2 DNA-d kahjustustest üle, ja teda võiks nimetada varu TLS DNA polümeraasiks.

„Mutageensuse“ operoni valkude interaktsioonide katsetulemused ei sobitu Warner *et al.* (2010) pakutud mudeliga. Meie katsete põhjal suudab *P. putida* DnaE2 ise seonduda β -klambriga ja ei vaja selleks ImuA ja ImuB kompleksi. Siin jääb ebaselgeks, milleks on vaja siis ImuA ja ImuB (kuigi nende olulisus operoni tööks on eksperimentaalselt tõestatud). Üks võimalusest võib olla see, et ImuA ja ImuB stabiliseerivad DNA-d kahjustuse kohal või tagavad nad DnaE2 täpsuse. „Mutageensuse“ operoni valkude *in vitro* uurimine võib valgust heita, kuidas nad koopereeruvad omavahel.

Kokkuvõte

Bakteritel, kel puuduvad *E. coli* Pol V homologid esineb sageli nn. „mutageensuse“ operon. See operon kodeerib replikatiivse DNA polümeraasi Pol III katalüütilise subühiku homoloogi DnaE2 ja Y-perekonna DNA polümeraaside homoloogi ImuB, mis ei ole aga DNA polümeraas. ImuA valgu aminohappelistel järjestustel on teatav sarnasus LexA, SulA ja RecA valkude järjestustega (Ippoliti *et al.*, 2012). Arvatakse, et „mutageensuse“ operoni poolt kodeeritud valgud võiksid täita Pol V sarnast rolli ja osaleda TLS-is. Seda seisukohta toetavad tulemused, mis on saadud bakterite *C. crescentus* ja *M. tuberculosis* „mutageensuse“ operoni poolt kodeeritud valkude funktsiooni uurimisel. Selgus, et neis bakterites osaleb „mutageensuse“ operon DNA kahjustuste poolt indutseeritud mutageneesis ja on suuteline läbi viima TLS-i. Samuti pakkusid Warner *et al.* (2010) välja võimaliku „mutageensuse“ operoni töömudeli, kus ImuA' seondus DNA-ga ja ImuB-ga, ImuB seondus β -klambriga ja DnaE2-ga, mis omakorda viis läbi TLS-i. Bakteri *P. putida* kromosoomis on samuti „mutageensuse“ operon. See operon koosneb neljast geenist (*lexA2*, *imuA*, *imuB*, *dnaE2*) ja kuulub SOS vastuse reguloni.

Käesolevas töös selgitasime „mutageensuse“ operoni osalust *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides, RecJ-i mõju tema tööle. Samuti selgitasime, kas „mutageensuse“ operoni valgud interakteeruvad omavahel ja teiste replikatsioonivalkudega. Põhilised tulemused on järgmised:

1. *P. putida* „mutageensuse“ operon ei osale UV- ja MMC-indutseeritud mutageneesis.
2. Pol IV (DinB) puudumisel osaleb „mutageensuse“ operon DNA alküülkahjustuste ületamisel.
3. RecJ puudumisel väheneb bakteris *P. putida* puhul rakkude töötlemisel UV-kiirgusega ja MMC-ga mutatsioonisagedus võrreldes metsiktüvega. Saadud tulemus on vastupidine sellele, mida on kirjeldatud bakteris *E. coli*.
4. „Mutageensuse“ operoni poolt kodeeritud valkude puhul tuvastasime järgmised interaktsioonid: ImuA seondub iseendaga ja ImuB-ga, DnaE2 ei seonu ei ImuA ega ImuB-ga, kuid interakteerub otseselt β -klambriga. Seega ei kehti *P. putida* rakkudes Warneri töögrupi „mutageensuse“ operoni mudel. T. Jatsenko on meie laboris näidanud, et DnaE2 vajab oma tööks ImuA ja ImuB valke (publitseerimata andmed). Kuna aga DnaE2 nendega ei interakteeru, on võimalik, et ImuA ja ImuB valkude roll DnaE2 aktiivsuse tagamisel on kaudne.

The involvement of „mutagenic“ operon in mutagenic processes in *P. putida*

Artemi Maljavin

Summary

Natural environment is not always optimal for bacteria growth. DNA and other major cell components (lipids, proteins) are constantly under attack by mutagenic agents and radiation. Therefore, different mechanisms have been evolved to deal with damages caused by those agents. The most global one is SOS response. It consists of more than 40 genes and is suppressed under normal conditions, but activated when DNA damage occurs. SOS response genes can be subdivided into two specific groups: one repairs damaged DNA (NER, BER, homologous recombination), the other tolerates them (TLS). Homologous recombination is important in double strand breaks and single strand gaps, caused by UV radiation and other damaging agents. RecJ is the key component in recombination pathways. Also, RecJ plays an important role in cell strategy choice at damaged DNA and prefers repair. If damaged DNA can not be repaired cell is forced to bypass it, because damaged DNA is cytotoxic. Bypass of damaged DNA is catalysed by specialised DNA polymerases (also called TLS polymerases) in the process called translesion DNA synthesis and is potentially mutagenic. In *E. coli*, there are 3 TLS polymerases: Pol II, Pol IV and Pol V. Each TLS polymerase is highly specific to the type of DNA damage. For example, Pol IV bypasses alkylated DNA bases and Pol V is responsible for UV-induced damage tolerance. In actino- and proteobacteria, no homologs of *E. coli* Pol V were found. Instead, the so called „mutagenic“ operon is widely spread across these bacterial phyla. It consists of *imuA*, *imuB* and *dnaE2* genes in different combinations and is thought to fulfill Pol V functions, therefore participate in TLS. In earlier studies of „mutagenic“ operon, one has been shown to be involved in UV-induced mutagenesis. Moreover, DnaE2 was shown to be specialised DNA polymerase, capable of DNA synthesis. *P. putida* possesses „mutagenic“ operon, which consists of *lexA2-imuA-imuB-dnaE2* genes.

The aim of this work was to study the involvement of „mutagenic“ operon in mutagenic processes, RecJ involvement in mutagenic processes and the interactions between „mutagenic“ operon proteins in *P. putida*.

The results of this work can be summarised as following:

1. „Mutagenic“ operon is not involved in UV- and MMC-induced mutagenesis.
2. In the absence of Pol IV, „mutagenic“ operon is involved in the bypass of alkylated DNA bases.

3. In RecJ deficient strain mutation frequency decreases in comparison to wild-type.
4. Following protein-protein interactions were found between „mutagenic operon“ components: ImuA interacts with itself and ImuB, DnaE2 does not interact either with ImuA or ImuB, but binds directly to β -clamp. This result is in contrast with previously published data, where ImuB was the central component in „mutasome“ arrangement and binding to β -clamp. Our laboratory unpublished DNA suggest that all „mutagenic“ operon proteins are essential for its work. Taking into account the fact that DnaE2 does not interact with ImuA or ImuB, the role of ImuA and ImuB in „mutagenic“ operon work may be indirect.

Kasutatud kirjandus

Aas, P. A., Otterlei, M., Falnes, P. Ø., Vågbø, C. B., Skorpen, F., Akbari, M., and Krokan, H. E. (2003). Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*, 421(6925), 859-863.

Abella, M., Erill, I., Jara, M., Mazon, G., Campoy, S. and Barbe, J. (2004). Widespread distribution of a *lexA*-regulated DNA damage-inducible multiple gene cassette in the Proteobacteria phylum. *Mol. Microbiol.*, 54, 212–222.

Battesti, A., and Bouveret, E. (2012). The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods*, 58(4), 325-334.

Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., and Broda, P. (1977). Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Molecular and General Genetics MGG*, 154(2), 203-204.

Bignami, M., O'Driscoll, M., Aquilina, G., and Karran, P. (2000). Unmasking a killer: DNA O 6-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 462(2), 71-82.

Bjedov, I., Dasgupta, C. N., Slade, D., Le Blastier, S., Selva, M., and Matic, I. (2007). Involvement of *Escherichia coli* DNA polymerase IV in tolerance of cytotoxic alkylating DNA lesions in vivo. *Genetics*, 176(3), 1431-1440.

Bjelland, S., and Seeberg, E. (2003). Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1), 37-80.

Bridges, B. A. (2005). Error-prone DNA repair and translesion DNA synthesis: II: The inducible SOS hypothesis. *DNA repair*, 4(6), 725-739.

Bridges, B. A. (2005). Error-prone DNA repair and translesion synthesis: focus on the replication fork. *DNA repair*, 4(5), 618-634.

Burckhardt, S. E., Woodgate, R., Scheuermann, R. H., and Echols, H. (1988). UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli*: overproduction, purification, and cleavage by RecA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(6), 1811-1815.

Butala, M., Žgur-Bertok, D., and Busby, S. J. (2009). The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(1), 82-93.

Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., and Loeb, L. A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *Journal of Biological Chemistry*, 267(1), 166-172.

Cohen, S. E., Godoy, V. G., and Walker, G. C. (2009). Transcriptional modulator NusA interacts with translesion DNA polymerases in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 191(2), 665-672.

Cohen, S. E., Lewis, C. A., Mooney, R. A., Kohanski, M. A., Collins, J. J., Landick, R., and Walker, G. C. (2010). Roles for the transcription elongation factor NusA in both DNA repair and damage tolerance pathways in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(35), 15517-15522

Courcelle, J., and Hanawalt, P. C. (1999). RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of replication in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG*, 262(3), 543-551.

Courcelle, C. T., Chow, K. H., Casey, A., and Courcelle, J. (2006). Nascent DNA processing by RecJ favors lesion repair over translesion synthesis at arrested replication forks in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9154-9159.

Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P. A., Vaagbø, C. B., Kavli, B., Bratlie, M. S., and Krokan, H. E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA repair*, 3(11), 1389-1407.

Erill, I., Camproy, S., Mazon, G. and Barbe, J. (2006). Dispersal and regulation of an adaptive mutagenesis cassette in the bacterial domain. *Nucleic Acids Research*. 1: 66-77

Fernandez de Henestrosa, A. R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J. J., Ohmori, H. and Woodgate, R. (2000). Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 6: 1560–1572.

Fijalkowska, I. J., Schaaper, R. M. and Jonczyk, P. (2012). DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi-DNA polymerase affair. *FEMS Microbiology Reviews*. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00338x.

Friedberg, E. C., Lehmann, A. R., and Fuchs, R. P. (2005). Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis?. *Molecular cell*, 18(5), 499-505.

Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., and Wood, R. D. (Eds.). (2005). *DNA repair and mutagenesis*. American Society for Microbiology Press.

Furukohri, A., Nishikawa, Y., Akiyama, M. T., and Maki, H. (2012). Interaction between *Escherichia coli* DNA polymerase IV and single-stranded DNA-binding protein is required for DNA synthesis on SSB-coated DNA. *Nucleic acids research*, 40(13), 6039-6048.

Galhardo, R. S., Rocha, R. P., Marques, M. V. and Menck, C. F. M. (2005). An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acid Research* 33 (8): 2603-2614.

Garibyan, L., Huang, T., Kim, M., Wolff, E., Nguyen, A., Nguyen, T., Diep, A., Hu, K., Iverson, A., Yang, H. and Miller, J. H. (2003). Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *DNA Repair (Amst)*. May 13;2(5):593-608.

Godoy, V. G., Jarosz, D. F., Simon, S. M., Abyzov, A., Ilyin, V., and Walker, G. C. (2007). UmuD and RecA directly modulate the mutagenic potential of the Y family DNA polymerase DinB. *Molecular cell*, 28(6), 1058-1070.

Goosen, N., and Moolenaar, G. F. (2008). Repair of UV damage in bacteria. *DNA repair*, 7(3), 353-379.

Han, E. S., Cooper, D. L., Persky, N. S., Sutra, V. A., Whitaker, R. D., Montello, M. L., and Lovett, S. T. (2006). RecJ exonuclease: substrates, products and interaction with SSB. *Nucleic acids research*, 34(4), 1084-1091.

Hori, M., Yonekura, S. I., Nohmi, T., Gruz, P., Sugiyama, H., Yonei, S., and Zhang-Akiyama, Q. M. (2010). Error-prone translesion DNA synthesis by Escherichia coli DNA polymerase IV (DinB) on templates containing 1, 2-dihydro-2-oxoadenine. *Journal of nucleic acids*, 2010.

Ippoliti, P. J., DeLateur, N. A., Jones, K. M., and Beuning, P. J. (2012). Multiple strategies for translesion synthesis in bacteria. *Cells*, 1(4), 799-831.

Ito, J., and Braithwaite, D. K. (1991). Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic acids research*, 19(15), 4045.

Jarosz, D. F., Godoy, V. G., Delaney, J. C., Essigmann, J. M., and Walker, G. C. (2006). A single amino acid governs enhanced activity of DinB DNA polymerases on damaged templates. *Nature*, 439(7073), 225-228.

Jatsenko, T., Tover, A., Tegova, R. and Kivisaar, M. (2010). Molecular characterization of Rif(r) mutations in Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas putida. *Mutat Res.* 683(1-2): 106-14.

Karimova, G., Ullmann, A., and Ladant, D. (2001). Protein-protein interaction between Bacillus stearothermophilus tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3(1), 73-82.

Kim, S. R., Matsui, K., Yamada, M., Gruz, P., and Nohmi, T. (2001). Roles of chromosomal and episomal dinB genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in Escherichia coli. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(2), 207-215.

Koonin, E. V. (2006). Temporal order of evolution of DNA replication systems inferred by comparison of cellular and viral DNA polymerases. *Biol Direct*, 1, 39.

- Koorits, L., Tegova, R., Tark, M., Tarassova, K., Tover, A. and Kivisaar, M. (2007). Study of involvement of ImuB and DnaE2 in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. Jun 1;6(6):863-8. Epub 2007 Feb 28.
- Kumari, A., Minko, I. G., Harbut, M. B., Finkel, S. E., Goodman, M. F., and Lloyd, R. S. (2008). Replication bypass of interstrand cross-link intermediates by *Escherichia coli* DNA polymerase IV. *Journal of Biological Chemistry*, 283(41), 27433-27437.
- Lehmann, A. R. and Fuchs, R. P. (2006). Gaps and forks in DNA replication: rediscovering old models. *DNA Repair (Amsterdam)* 5, 1495 – 1498.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *nature*, (362), 709-15.
- Little, J. W. (1991). Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochemie* 73:411-421.
- Little, J. W. and Mount, D. W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 29:11-22.
- Lopes, M., Foiani, M. and Sogo, J. M. (2006). Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol. Cell* 21, 15 – 27.
- Lovett, S. T., and Clark, A. J. (1984). Genetic analysis of the *recJ* gene of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 157(1), 190-196.
- Lovett, S. T., and Kolodner, R. D. (1989). Identification and purification of a single-stranded-DNA-specific exonuclease encoded by the *recJ* gene of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2627-2631.

Martínez-García, E., and de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*, 13(10), 2702-2716.

Morimatsu, K., and Kowalczykowski, S. C. (2014). RecQ helicase and RecJ nuclease provide complementary functions to resect DNA for homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(48), E5133-E5142.

Nohmi, T., Battista, J. R., Dodson, L. A., and Walker, G. C. (1988). RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(6), 1816-1820.

Nohmi, T. (2006). Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 231-253.

Nowosielska, A., Smith, S. A., Engelward, B. P., and Marinus, M. G. (2006). Homologous recombination prevents methylation-induced toxicity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 34(8), 2258-2268.

Ohmori, H., Friedberg, E. C., Fuchs, R. P., Goodman, M. F., Hanaoka, F., Hinkle, D., ... and Woodgate, R. (2001). The Y-family of DNA polymerases. *Molecular cell*, 8(1), 7-8.

Ohmori, H., Hatada, E., Qiao, Y., Tsuji, M., and Fukuda, R. (1995). dinP, a new gene in *Escherichia coli*, whose product shows similarities to UmuC and its homologues. *Mutation Research Letters*, 347(1), 1-7.

Ollivierre, J. N., Fang, J., and Beuning, P. J. (2010). The roles of UmuD in regulating mutagenesis. *Journal of nucleic acids*, 2010.

Opperman, T., Murli, S., Smith, B. T., and Walker, G. C. (1999). A model for a umuDC-dependent prokaryotic DNA damage checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16), 9218-9223.

Panigrahi, G. B., and Walker, I. G. (1990). The N2-guanine adduct but not the C8-guanine of N6-adenine adducts formed by 4-nitroquinoline 1-oxide blocks the 3'-5' exonuclease action of T4 DNA polymerase. *Biochemistry*, 29(8), 2122-2126.

Patel, M., Jiang, Q., Woodgate, R., Cox, M. M. and Goodman, M. F. (2010). A new model for SOS-induced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase V. *Crit Rev Biochem Molec Biol* 3: 171-184.

Posfai G. , Kolisnychenko V., Berczki Z. and Blattner F.R. (1999). Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double - strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res.* 27 :4409 – 4415.

Prakash, S., Johnson, R. E., and Prakash, L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 317-353.

Radman, M. (1975). SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. In *Molecular mechanisms for repair of DNA* (pp. 355-367). Springer US.

Sale, J. E., Lehmann, A. R., and Woodgate, R. (2012). Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(3), 141-152.

Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Barbé, J. and Erill, I. (2012). Analysis of the SOS response of *Vibrio* and other bacteria with multiple chromosomes. *BMC Genomics* 13:58.

Sharma, R. C., and Schimke, R. T. (1996). Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques*, 20(1), 42-44.

Sedgwick, B. (2004). Repairing DNA-methylation damage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(2), 148-157.

Shen, X., Sayer, J. M., Kroth, H., Pontén, I., O'Donnell, M., Woodgate, R., ... and Goodman, M. F. (2002). Efficiency and accuracy of SOS-induced DNA polymerases replicating benzo [a] pyrene-7, 8-diol 9, 10-epoxide A and G adducts. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 5265-5274.

Schlacher, K., Leslie, K., Wyman, C., Woodgate, R., Cox, M.M., and Goodman, M.F. (2005). DNA polymerase V and RecA protein, a minimal mutasome. *Mol. Cell* 17, 561 – 572.

Shinagawa, H., Iwasaki, H., Kato, T., and Nakata, A. (1988). RecA protein-dependent cleavage of UmuD protein and SOS mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(6), 1806-1810.

Sladewski, T. E., Hetrick, K. M., and Foster, P. L. (2011). Escherichia coli Rep DNA helicase and error-prone DNA polymerase IV interact physically and functionally. *Molecular microbiology*, 80(2), 524-541.

Tang, M., Pham, P., Shen, X., Taylor, J. S., O'Donnell, M., Woodgate, R., and Goodman, M. F. (2000). Roles of E. coli DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. *Nature*, 404(6781), 1014-1018.

Tang, M., Shen, X., Frank, E. G., O'Donnell, M., Woodgate, R. and Goodman, M. F. (1999). UmuD'2C is an error-prone DNA polymerase, Escherichia coli pol V. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96, 8919–8924.

Wagner, J., Gruz, P., Kim, S. R., Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R. P., and Nohmi, T. (1999). The dinB gene encodes a novel E. coli DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Molecular cell*, 4(2), 281-286.

Wagner, J., Fujii, S., Gruz, P., Nohmi, T., and Fuchs, R. P. (2000). The β clamp targets DNA polymerase IV to DNA and strongly increases its processivity. *EMBO reports*, 1(6), 484-488.

Warner, D. F., Ndwandwe, D. E., Abrahams, G. L., Kana, B. D., Machowski, E. E., Venclovas, Č. and Mizrahi, V. (2010). Essential roles for imuA'- and imuB-encoded

accessory factors in DnaE2-dependent mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. PNAS 29:13098-98.

Waters, L. S., Minesinger, B. K., Wiltrout, M. E., D'Souza, S., Woodruff, R. V. and Walker, G. C. (2009). Eukaryotic Translesion Polymerases and Their Roles and Regulation in DNA Damage Tolerance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73: 134–154.

Waters, L. S. and Walker, G. C. (2006) The critical mutagenic translesion DNA polymerase Rev1 is highly expressed during G(2)/M phase rather than S phase. Proc. Natl Acad. Sci. USA 103, 8971 – 8976.

Wertman, K. F. and Mount, D. W. (1985). Nucleotide sequence binding specificity of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12. Journal of bacteriology 163: 376-384.

Whiteway, J., Koziarz, P., Veall, J., Sandhu, N., Kumar, P., Hoecher, B., and Lambert, I. B. (1998). Oxygen-Insensitive Nitroreductases: Analysis of the Roles of *nfsA* and *nfsB* in Development of Resistance to 5-Nitrofur Derivatives in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 180(21), 5529-5539.

Zheng Y-H, Shen, F-T., Tan, C-C., Huang, C-C. and Young, C-C. (2011). The flexibility of UV-inducible mutation in *Deinococcus ficus* as evidenced by the existence of the *imuB*–*dnaE2* gene cassette and generation of superior feather degrading bacteria. Microbiological Research 1: 40–47

Kasutatud veebiadressid

EUROMEDEX protokoll:

http://static.bioport.cn/data/upload/product/specification/396/1342594983673_396560.pdf